



# **Viabilidade económica e energética do biodiesel produzido a partir de *Chlorella vulgaris***

**TIAGO JOEL PINTO RIBEIRO**

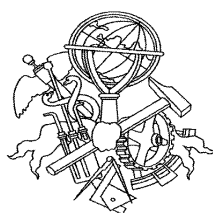
Novembro de 2013

Viabilidade económica e energética do biodiesel  
produzido a partir de *Chlorella vulgaris*

Tiago Joel Pinto Ribeiro

Dissertação submetida para a obtenção do grau de Mestre em  
Energias Sustentáveis

Instituto Superior de Engenharia do Porto  
Departamento de Engenharia Mecânica



18 de Novembro de 2013





Relatório da Unidade Curricular de Dissertação/Projeto/Estágio do 2º ano do Mestrado em  
Energias Sustentáveis

Candidato: Tiago Joel Pinto Ribeiro, N° 1101617, 1101617@isep.ipp.pt

Orientação Científica: Nídia Caetano, NSC@isep.ipp.pt

Coorientação Científica: Leonardo Ribeiro, LSR@isep.ipp.pt

Mestrado em Engenharia Energias Sustentáveis

Departamento de Engenharia Mecânica

Instituto Superior de Engenharia do Porto



18 de Novembro de 2013



*Dedico este meu trabalho à minha família, Eduardo Ribeiro, Cândida Ribeiro e Simão Ribeiro, por me proporcionarem uma base estável, a todos os níveis, que me permitiu alcançar esta etapa da minha vida. Por último, mas não menos importante, dedico à minha namorada, Ana Filipa, por compreender as horas de ausência.*





## *Agradecimentos*

À minha orientadora, Nídia Caetano e ao meu coorientador Leonardo Ribeiro pela oportunidade de desenvolver este trabalho, e pela orientação e apoio prestado durante a realização do mesmo.

Às colegas de laboratório, Carolina Melo, Janaina Rodrigues, Raquel Moura e Adelaide Martins pelo apoio prestado em laboratório durante a elaboração deste trabalho.

À Quimitécnica que gentilmente forneceu a amostra de floculante Pax XL-10, bem como a todos os elementos do CIETI, que gentilmente forneceram a cromatografia gasosa efetuada ao biodiesel, em especial à Joana.

E a todos que, direta e indiretamente, estiveram relacionados neste trabalho, um grande e sincero agradecimento.



## *Resumo*

Contemporaneamente o Homem depara-se com um dos grandes desafios que é o de efetivar a transição para um futuro sustentável. Assim, o setor da energia tem um papel fundamental neste processo de transição, com principal enfoque no setor dos automóveis, sendo este um setor que contribui com elevadas quantidades de gases de efeito estufa libertados para a atmosfera. Também a escassez dos recursos petrolíferos constitui um ponto fundamental no tema apresentado. Com a necessidade de combater esses problemas é que se tem vindo a tentar desenvolver combustíveis renováveis e neutros quanto às emissões.

A primeira geração de biocombustíveis obtidos através de culturas agrícolas terrestres preenche em parte esses requisitos, porém, não atinge os valores da procura e ainda competem com a produção de alimentos. Daí o interesse na aposta de uma segunda geração de biocombustíveis produzidos de fontes que não pertencem à cadeia alimentar e são residuais mas, que mesmo assim não permitem satisfazer as necessidades de matéria-prima. A terceira geração de biocombustíveis vem justamente responder a estas questões pois assenta em matérias-primas que não competem pela utilização do solo agrícola nem são usadas para fins alimentares, tendo produtividades areais substancialmente superiores às que as culturas convencionais ou biomassas residuais conseguem assegurar. A matéria-prima de terceira geração são portanto as microalgas, cujas produtividades em biomassa são extremamente elevadas, para além de produtividades muito superiores em lípidos, hidratos de carbono e/ou outros produtos de valor elevado.

No entanto, este tipo de produção de biocombustível ainda enfrenta alguns problemas técnicos que o tornam num processo dispendioso para competir economicamente com outros tipos de produção de biodiesel.

Na linha do que foi dito anteriormente, este trabalho apresenta um estudo de viabilidade económica e energética do biodiesel produzido através da *Chlorella vulgaris*, apresentando as técnicas e resultados de cultivo da *Chlorella vulgaris* e posteriormente de produção do biodiesel através dos lípidos obtidos através da mesma.

Para melhorar a colheita das microalgas, que é uma das fases mais dispendiosas, testou-se o aumento de pH e a adição de um flocculante (Pax XL-10), sendo que o primeiro não permitiu obter resultados satisfatórios, enquanto o segundo permitiu obter resultados de rendimento na ordem dos 90%. Mesmo com a melhoria da etapa da colheita, o preço mínimo do biodiesel produzido a partir do óleo de *Chlorella vulgaris*, com as condições ótimas de cultivo e produtividades máximas encontradas na literatura, foi de 8,76 €/L, pois, na análise económica, o Pax XL-10 revelou-se extremamente caro para utilizar na floculação de microalgas para obtenção de um produto de baixo valor, como é o biodiesel. A não utilização da floculação reduz o preço do biodiesel para 7,85 €/L.

O que se pode concluir deste trabalho é que face às técnicas utilizadas, a produção de biodiesel *Chlorella vulgaris* apenas, não é economicamente viável, pelo que para viabilizar a sustentabilidade do processo seria ainda necessário desenvolver mais esforços no sentido de otimizar a produção de biodiesel, eventualmente associando-a à produção de um outro biocombustível produzido a partir da biomassa extraída residual e/ou da recuperação de outros produtos de maior valor.

### ***Palavras-Chave***

Biodiesel, *Chlorella vulgaris*, floculação, microalgas, viabilidade económica.

## *Abstract*

At present Man faces a major challenge, which is to carry out the transition to a sustainable future. Thus, the energy sector plays a key role in this transition process, with the main focus on the automobile industry, which is an industry that contributes with large amounts of greenhouse gases (GHG) released into the atmosphere. Also the shortage of petroleum resources is a key point in this thematic. The need to face these problems is the driving force to develop renewable fuels and with neutral emissions.

First generation biofuels, obtained from terrestrial agriculture crops fills in part these requirements; however it does not reach the consumption requirements and also competes with food production. Thus, the interest in a second generation of biofuels produced from sources not included in the food chain and are of residual origin but that still are not able to fulfill the raw material needs. The third generation of biofuels aims precisely at giving an answer to these questions as it is based on raw materials that do not compete for the use of agricultural soil or are used for food purposes, having areal yields substantially higher than conventional crops or residual biomasses can ensure. Therefore, the raw material of third generation biofuels are microalgae, whose biomass yields are extremely high, and that yield much higher lipids, carbohydrates and/or other high-value compounds productivities.

However, this kind of biofuel production still faces some technical problems that make it a costly process, still unable to economically compete with other types of biodiesel production.

According to what was said previously, this work presents an economical and energetic viability study of the biodiesel produced from *Chlorella vulgaris* biomass, presenting the techniques and results of the cultivation of *Chlorella vulgaris* and subsequent biodiesel production from its extracted lipids.

Even by improving the collection phase, with the optimum cultivation conditions and maximum productivity found in the literature, the lowest price of the biodiesel produced from *Chlorella vulgaris* oil was 8,76 €/L because in the economic analysis the Pax XL-10 proved to be extremely expensive to use for flocculating microalgae to obtain a

product of low value, such as biodiesel. We can reduce the price of biodiesel for € 7.85 / L if the flocculation wasn't done.

Therefore it can be concluded from this work that with the techniques used, biodiesel production from *Chlorella vulgaris* is not economically viable. In order to make biodiesel from microalgae *Chlorella vulgaris* sustainably viable it is still needed to make additional efforts in the optimization of biodiesel production, eventually considering the simultaneous production of another biofuel produced from extracted residual biomass and/or with the recovery of other higher value products from the microalgae.

### ***Keywords***

Biodiesel, *Chlorella vulgaris*, economic viability, flocculation, microalgae.

# Índice

<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>III</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE .....</b>	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>XIII</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>XVII</b>
<b>NOMENCLATURA .....</b>	<b>XXI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS .....	1
1.2. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO .....	2
<b>2. BIODIESEL .....</b>	<b>5</b>
2.1. ENQUADRAMENTO .....	5
2.2. MATÉRIAS-PRIMAS USADAS NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL .....	6
<b>3. PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE MICROALGAS .....</b>	<b>9</b>
3.1. ENQUADRAMENTO .....	9
3.2. ETAPAS DO PROCESSO .....	10
3.3. CUSTO DO BIODIESEL .....	19
<b>4. TRABALHO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>21</b>
4.1. ESCOLHA DA MICROALGA .....	21
4.2. CULTIVO DA MICROALGA <i>CHLORELLA VULGARIS</i> .....	22
4.3. PROCESSO DE COLHEITA DAS MICROALGAS .....	25
4.4. EXTRAÇÃO DE ÓLEO POR SOLVENTE .....	27
4.5. PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DO ÓLEO EXTRAÍDO DA <i>CHLORELLA VULGARIS</i> .....	29
<b>5. RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
5.1. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA <i>CHLORELLA VULGARIS</i> .....	31
5.2. FLOCULAÇÃO DA BIOMASSA ALGAL .....	33
5.3. EXTRAÇÃO DE LÍPIDOS .....	38
5.4. ESTERIFICAÇÃO E TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MICROALGAS .....	40
5.5. ANÁLISE DOS ÉSTERES METÁLICOS DE ÁCIDOS GORDOS .....	41
<b>6. ANÁLISE ECONÓMICA .....</b>	<b>45</b>
6.1. IDENTIFICAÇÃO, DIMENSIONAMENTO E CUSTOS DO SISTEMA DE CULTURA .....	45

6.2.	CUSTO DO MEIO DE CULTURA .....	47
6.3.	CUSTO ASSOCIADOS À RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA .....	48
6.4.	CUSTOS ASSOCIADOS À EXTRAÇÃO DOS LÍPIDOS .....	49
6.5.	CUSTOS DO PROCESSO DE TRANSESTERIFICAÇÃO .....	49
6.6.	CUSTO DO BIODIESEL .....	50
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>52</b>
<b>8.</b>	<b>AVALIAÇÃO DO TRABALHO REALIZADO.....</b>	<b>55</b>
8.1.	OBJETIVOS REALIZADOS.....	55
8.2.	LIMITAÇÕES E TRABALHOS FUTUROS .....	55
	<b>REFERÊNCIAS DOCUMENTAIS.....</b>	<b>57</b>
	<b>ANEXO A. CALIBRAÇÃO - CURVAS DE CRESCIMENTO DA <i>CHLORELLA VULGARIS</i>. .....</b>	<b>60</b>
	<b>ANEXO B. CRESCIMENTO DAS CULTURAS DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i>.....</b>	<b>63</b>
	<b>ANEXO C. AUMENTO DO PH COMO MEIO DE INDUÇÃO DA FLOCULAÇÃO.....</b>	<b>66</b>
	<b>ANEXO D. ANÁLISE DOS ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GORDOS.....</b>	<b>67</b>







## Índice de Figuras

Figura 1	Etapas do processo de produção de biodiesel a partir de óleo de microalgas (adaptado de [11]).	10
Figura 2	Reatores utilizados no cultivo de microalgas: (a) lagoas abertas e fotobiorreatores (b) placa plana, (c) tubos inclinados [16] e (d) tubos horizontais [17].	12
Figura 3	Curva de crescimento de uma cultura microalgal em reator fechado.	14
Figura 4	Reação de transesterificação (adaptado de [31]).	18
Figura 5	Câmara de fluxo laminar Cruma 870-FL	22
Figura 6	Culturas de <i>Chlorella vulgaris</i> em <i>erlenmeyers</i> de 1L. À esquerda: dia 0 da inoculação; à direita: identificação da cultura que está pronta a inocular <i>Erlenmeyers</i> de 5 L.	24
Figura 7	Espectrofotômetro <i>Shimadzu</i> UV-160 A, usado na avaliação da densidade ótica.	25
Figura 8	– Sistema <i>Jar-test</i> ISCO – JF/6, usado nos ensaios de floculação.	27
Figura 9	Fases após a extração de lípidos pelo método de <i>Bligh and Dyer</i> .	28
Figura 10	Fases observadas na extração de lípidos pelo método de <i>Halim</i> .	29
Figura 11	– Avaliação do crescimento da <i>Chlorella vulgaris</i> (primeiro aquário 30 L).	31
Figura 12	Cultura em fotobiorreator de 30 L.	32
Figura 13	Avaliação do crescimento <i>Chlorella vulgaris</i> (segundo fotobiorreator 30 L).	33
Figura 14	Absorvância do sobrenadante após 45 min.	34
Figura 15	Absorvância do sobrenadante após 90 min.	34
Figura 16	Cultura após adição de NaOH.	35
Figura 17	A) Amostras após a adição de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 mL de Pax XL-10, com agitação durante 15 min a 25 rpm; B) Resultados para adição de 1 mL de Pax XL-10, após 60 min de repouso; C) Resultado para as restantes adições após 60 min de repouso (resultados todos idênticos).	35
Figura 18	Resultados após adição de Pax XL-10 nas quantidades indicadas na foto, com agitação rápida a 70 rpm (3 min) + agitação lenta a 25 rpm (15 min) e 60 min de repouso.	37
Figura 19	Água e isopropanol recuperados após a extração dos lípidos.	40
Figura 20	Aspeto da mistura do biodiesel e glicerol obtidos por transesterificação.	41
Figura 21	Cromatograma do biodiesel (ésteres do óleo)	42
Figura 22	Sistema de cultivo de microalgas em lagoas <i>raceway</i> [43].	46
Figura 23	Curva de calibração de densidade ótica vs concentração de biomassa seca para a <i>Chlorella vulgaris</i> .	61
Figura 24	Soluções-padrão preparadas a partir da biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> .	61
Figura 25	Pico máximo de absorvância da cultura mãe.	62
Figura 26	Cromatografia ao biodiesel do 1º ensaio (Figura 21).	68
Figura 27	Cromatografia ao biodiesel: 4º ensaio.	69

Figura 28	Cromatografia do biodiesel do 5º ensaio. ....	70
Figura 29	Cromatografia do biodiesel: 6º ensaio. ....	71





## Índice de Tabelas

Tabela 1	Óleo extraído de diferentes matérias oleaginosas convencionais e de microalgas [10].	7
Tabela 2	Teor lipídico, produtividade de lípidos e de biomassa de diferentes espécies (adaptado de [11]).	11
Tabela 3	Vantagens e limitações dos diversos sistemas de cultura de algas [15].	13
Tabela 4	Comparação de produtividade obtida em fotobiorreatores e sistemas abertos (adaptado de [8]).	14
Tabela 5	Composição (% mássica) em ácidos gordos, com cadeias de 14 a 22 átomos de carbono, da espécie <i>Chlorella vulgaris</i> [32].	18
Tabela 6	Comparação do preço da biomassa produzida em fotobiorreatores e <i>Raceways</i> (adaptado de [8]).	19
Tabela 7	Composição do meio BBM 3N modificado.	23
Tabela 8	Rendimento da colheita com floculação induzida por adição de 1 mL de Pax XL-10.	36
Tabela 9	Rendimento da colheita de microalgas com adição de 0,75, 0,90 e 1 mL de Pax XL-10.	37
Tabela 10	Quantidade de lípidos obtidos com aproximadamente 1 g de biomassa húmida.	38
Tabela 11	Quantidade de lípidos obtidos pelo método de <i>Halim</i> .	39
Tabela 12	Quantidade de biodiesel obtida por esterificação pelo método de Lepage e Roy.	40
Tabela 13	Ésteres identificados e sua quantificação no total de amostra.	42
Tabela 14	Custos associados à aquisição e funcionamentos dos equipamentos básicos.	46
Tabela 15	Custos associados à aquisição do terreno e da lona PEBD.	47
Tabela 16	Custos associados à preparação do meio de cultura.	48
Tabela 17	Custos associados à floculação.	48
Tabela 18	Custo associados à extração de lípidos.	49
Tabela 19	Custos associados ao processo de transesterificação.	49
Tabela 20	Custo do biodiesel.	50
Tabela 21	Custo do biodiesel com valores de produção referenciados na literatura.	50
Tabela 22	Valores de densidade ótica obtidos para as diferentes concentrações.	60
Tabela 23	Avaliação do crescimento da cultura de <i>Chlorella vulgaris</i> em fotobiorreator de 30 L.	63
Tabela 24	Absorvância do sobrenadante obtido com o aumento do pH.	66
Tabela 25	Resultados da cromatografia 1º ensaio.	67
Tabela 26	Resultados da cromatografia: 4º ensaio.	68
Tabela 27	Resultados da cromatografia: 5º ensaio.	69
Tabela 28	Resultados da cromatografia do 6º ensaio.	70
Tabela 29	Teor (%) de ésteres para cada ensaio e respetivas médias finais.	71

Tabela 30	Área dos picos para cada ensaio e respetiva médias finais.....	71
-----------	--	----







## *Nomenclatura*

### **Carateres Gregos**

$\lambda$  – Comprimento de onda

### **Abreviaturas**

ASP – Programa de Espécies Aquáticas

BBM – *Bold Basal Medium*

EEA – *European environment agency*

FAME – *Fatty Acid Methy Ester*

NREL – *National Renewable Energy Laboratory*

PUFA – Ácidos Gordos Polinsaturados

UE – União Europeia



# 1. Introdução

O tema da melhoria ambiental aliado à crescente necessidade de obtenção de novas fontes energéticas tornou-se uma das grandes preocupações da sociedade atual. Tais inquietações surgiram inicialmente nos anos 70, após a crise energética e foram reconhecidas na Conferência das Nações Unidas sobre o Ambiente, realizada em Estocolmo, em 1972.

Segundo os dados da Agência Europeia do Ambiente (EEA) [1] constatamos que, atualmente, a União Europeia (UE) ainda está fortemente dependente dos combustíveis fósseis, correspondendo a 76,4% do consumo de energia primária, enquanto as energias renováveis representam apenas 9,8%.

Entre 1990 e 2010, o consumo final de energia na UE aumentou cerca de 7,1%, sendo o setor dos transportes responsável por quase um terço do consumo de energia final (estatísticas Eurostat Energia) e cerca de um quarto do total de emissões de CO<sub>2</sub> [2]. A melhoria da eficiência energética dos transportes pode portanto, resultar numa redução considerável no consumo de energia e de emissões de CO<sub>2</sub>, mas deverá também passar pela introdução de combustíveis mais “verdes”, nomeadamente de biocombustíveis.

## 1.1. Motivação e objetivos

O uso de fontes de energia renováveis é visto como um elemento-chave na política energética europeia e nacional, pois poderá reduzir a dependência dos combustíveis importados de países não pertencentes à UE e diminuir também as emissões de fontes de combustíveis fósseis e os custos de energia associados aos preços do petróleo. A Diretiva

2009/28/CE [3], relativa à promoção da utilização de energia proveniente de fontes renováveis, tornou-se uma legislação vinculativa, conhecida como os objetivos 20-20-20. Este "pacote clima-energia" inclui as seguintes metas para o ano 2020:

- As emissões de gases de efeito estufa da UE devem ser reduzidas para valores pelo menos 20% inferiores aos níveis de 1990;
- Pelo menos 20% do consumo final bruto de energia da UE deve ser proveniente de fontes renováveis de energia;
- Pelo menos 10% do consumo final de energia nos transportes deve ser proveniente de fontes renováveis de energia;
- Deve ser conseguida uma redução de 20% no consumo de energia primária em comparação com os níveis projetados, através da melhoria da eficiência energética.

Desta forma, podemos constatar que o estabelecimento da meta de pelo menos 10% da energia de consumo final proveniente de energias renováveis, aliado ao facto da recente volatilidade dos preços do petróleo bruto e do aumento do preço já esperado, em paralelo com o desejo de reduzir as emissões de poluentes e de gases de efeito estufa, vem tornar apetecível o investimento em energias renováveis, nomeadamente no biodiesel, uma vez que é um substituto direto do diesel fóssil, usado intensivamente nos transportes.

Face ao exposto, temos como objetivo principal neste trabalho: a análise da viabilidade, tanto económica como energética, do biodiesel produzido a partir de microalgas.

Para atingir este objetivo, foi selecionada uma alga de crescimento rápido, tendo sido realizado trabalho experimental com os seguintes objetivos intermédios:

- Cultivo de microalgas, *Chlorella vulgaris*;
- Identificação e aplicação de uma técnica de separação de microalgas do meio de cultura, com uma boa relação preço/eficiência;
- Extração do óleo das microalgas;
- Transesterificação e avaliação do perfil lipídico do óleo extraído das microalgas;
- Determinação experimental do poder calorífico do biodiesel produzido.

## **1.2. Organização da dissertação**

Este trabalho está organizado numa parte teórica e numa parte experimental. A parte teórica está inserida no Capítulo 1 até ao Capítulo 3. A parte experimental está descrita no

Capítulo 4 até ao Capítulo 6. Por fim, os dois últimos Capítulos conclusivos. Cada capítulo está organizado em subcapítulos e este por sub-subcapítulos. No início de cada capítulo apresenta-se um resumo do mesmo.

- **Parte Teórica**

Após esta breve introdução com a contextualização do tema e os objetivos do trabalho, serão apresentados mais dois capítulos:

No **Capítulo 2** será abordado o tema Biodiesel: o seu enquadramento quanto às ferramentas adotadas para impulsionar a sua produção, passando por uma breve descrição das diferentes matérias-primas utilizadas na produção do biodiesel.

No **Capítulo 3** será apresentado o tema da Produção de biodiesel a partir de microalgas. Neste capítulo serão abordadas e explicadas as etapas de processo de biodiesel. Por último, é efetuada uma análise ao custo do biodiesel.

- **Parte experimental**

Esta segunda parte diz respeito ao trabalho experimental realizado com a finalidade de obter informação que será utilizada na estimativa dos custos do processo. Desta forma, serão apresentados mais 5 capítulos, sendo os últimos dois de caráter conclusivo:

No **Capítulo 4** serão apresentados as técnicas e os métodos utilizados no trabalho experimental sendo descrito o modo de operação nas várias fases.

No **Capítulo 5** serão apresentados os resultados obtidos bem como a sua discussão.

No **Capítulo 6** será apresentada a estimativa dos custos do processo bem como a sua discussão.

No **Capítulo 7** serão contempladas as conclusões do trabalho desenvolvido.

No **Capítulo 8** será apresentada uma avaliação ao trabalho realizado, bem como as suas limitações e a realizar futuramente.





## 2. Biodiesel

Este capítulo tem como principal objetivo, apresentar uma breve descrição das principais políticas de incentivo à produção do biodiesel, seguido de uma exposição sobre as principais fontes de matéria-prima para obtenção do biodiesel, comparando-as.

### 2.1. Enquadramento

Segundo as Nações Unidas, a população mundial vai aumentar em 2,5 mil milhões ao longo dos próximos 43 anos, passando dos atuais 6,7 a 9,2 mil milhões em 2050 [4].

Como resultado do aumento da população mundial, e da alteração dos padrões de vida nas economias em desenvolvimento, é esperado um aumento na procura de biomassa, para alimentos e ração animal, superior a 50% nas próximas duas décadas [5].

Simultaneamente, há várias iniciativas para substituir uma economia baseada em combustíveis fósseis por uma economia de base biológica, em que a biomassa substitui o petróleo como fonte de combustível para os transportes e como matéria-prima para a indústria química [6].

Em Portugal, num dos mecanismos legais de apoio aos biocombustíveis, o Decreto-Lei n.º 117/2010, de 25 de outubro, foi estabelecida uma meta de incorporação de biocombustíveis

para cada um dos anos, a que as entidades que introduzem combustíveis no consumo (incorporadores) estão obrigadas. Estas metas são, em teor energético [7]:

- 5,5% para 2013 e 2014;
- 7,5% para 2015 e 2016;
- 9,0% para 2017 e 2018;
- 10,0% para 2019 e 2020.

Este Decreto-Lei vai ao encontro do estipulado na Diretiva 2009/28/CE [3], relativa à promoção da utilização de energia proveniente de fontes renováveis, já mencionada anteriormente.

## **2.2. Matérias-primas usadas na produção de biodiesel**

O biodiesel pode ser obtido através de óleos vegetais com origem em várias fontes, estando representados na Tabela 1 os mais convencionais.

É pouco provável que a produção de biomassa agrícola possa atender à crescente procura, portanto, há uma necessidade urgente de obter novas fontes de biomassa que não compitam com a agricultura. As microalgas, hoje em dia, são consideradas a fonte de biomassa mais promissora. O biodiesel derivado de oleaginosas é um combustível renovável e uma alternativa de carbono neutro para combustíveis derivados do petróleo. Infelizmente, o biodiesel produzido a partir de oleaginosas, resíduos de óleo de cozinha e gordura animal não consegue realisticamente satisfazer, até mesmo uma pequena fração, da necessidade atual dos combustíveis para transportes. Por exemplo, se a palma, que é uma cultura de alto rendimento em óleo, fosse cultivada para atender apenas a 50% das necessidades de combustível de transporte dos EUA, seriam necessários 24% do total de área de cultivo dos EUA; No caso do milho, seriam necessários cerca de 846% da área de cultivos dos EUA se o milho fosse cultivado para satisfazer a mesma procura, enquanto apenas 3% da mesma área de cultivo dedicada à produção de microalgas, seria o suficiente para a produção de biomassa das algas capaz de satisfazer os mesmos 50% de necessidades do combustível dos transportes [8].

As matérias-primas usadas atualmente para a produção de biodiesel enfrentam alguns problemas graves que limitam a sua capacidade para se tornarem um substituto eficaz dos combustíveis fósseis nos meios de transporte. Por exemplo, a utilização de óleos vegetais alimentares (como o óleo de soja), também usados para o consumo humano, pode levar a

aumentos dos preços dos alimentos e até mesmo à escassez destes. Além disso, a utilização de terras aráveis vai aumentar a pressão sobre a oferta de alimentos, o que pode levar à perda de biodiversidade. Também, como as tradicionais matérias-primas são baseadas em culturas anuais, em maus anos agrícolas surgem problemas de escassez de potenciais matérias-primas, representando assim ameaças adicionais ao atual sistema de produção de biodiesel, não esquecendo ainda o problema do armazenamento que é originado pela sazonalidade das culturas convencionais [9].

Atualmente nenhum estudo apresenta resultados concretos que possam definir a melhor espécie de microalgas para produzir biodiesel em grande escala, mas comparando com a Tabela 1, apresentada em seguida, podemos constatar que as microalgas são indiscutivelmente, uma forma bastante promissora para produção de biodiesel, conseguindo produzir 1.000.000 de litros em 28 hectares e tendo uma produção anual de 35.100 litros de óleo. Comparando com os resultados da Colza (2º melhor resultado), as microalgas são bastante mais eficientes na produção de óleo para obtenção de biodiesel.

**Tabela 1 Óleo extraído de diferentes matérias oleaginosas convencionais e de microalgas [10].**

<b>Cultura</b>	<b>Óleo extraído (L/ha.ano)</b>	<b>Área para produção de 1000000 L de óleo (ha)</b>
Soja	446	2242
Colza	1190	840
Girassol	810	1235
Microalgas	35100	28

A ideia de produzir biodiesel a partir de microalgas tomou forma no Projeto National Renewable Energy Laboratory (NREL) através do Programa de Espécies Aquáticas (ASP). Tal aconteceu após a constatação de que sob certas condições, as microalgas acumulam altas quantidades de lípidos. Desde então, uma série de pesquisas têm-se concentrado no desenvolvimento de sistemas de cultivo viáveis, de uma maneira económica e ambientalmente correta, em especial a identificação das condições de crescimento ideais que assegurem alto teor de óleo e os melhores métodos para o processamento de biomassa de microalgas .

De 1987 a 1990, foi efetuado um "Ensaio ao ar livre" numa área de 2000 m<sup>2</sup>, com lagoas de alto rendimento, em *Roswell*, Novo México. Concluiu-se que o uso de microalgas para a

produção a baixo custo de biodiesel foi tecnicamente possível, mas ainda era necessário um período considerável de investigação e desenvolvimento para alcançar as altas produtividades requeridas [11].

Devido a preocupações atuais sobre o aquecimento global, o aumento do consumo de combustíveis fósseis e o aumento do preço do petróleo, a mesma ideia continua a atrair muita atenção. Na verdade, as microalgas são atualmente vistas como uma matéria-prima alternativa viável para a produção de biocombustíveis e outros bio-produtos [11], [12], incorporando na sua biomassa o  $\text{CO}_2$  resultante da combustão, por assimilação através do processo de fotossíntese

# 3. Produção de biodiesel a partir de microalgas

Neste capítulo, são apresentadas as principais técnicas de produção de biodiesel a partir de microalgas. Por último, é efetuada uma análise bibliográfica ao custo de produção do biodiesel obtido através das microalgas.

## 3.1. Enquadramento

As microalgas constituem um grupo distinto de microrganismos fotossintéticos, unicelulares ou coloniais, presentes em meios aquáticos doces ou salinos. Estas organizam-se e dividem-se em três classes principais, em termos de abundância: as diatomáceas (*Bacillariophyceae*), as algas verdes ou clorófitas (*Chlorophyceae*), as algas douradas ou crisófitas (*Chrysophyceae*). Consideram-se também as algas azuis ou cianobactérias (*Cyanophyceae*) [13]. Características como a elevada taxa de crescimento, a elevada capacidade de produção de óleos e, uma maior eficiência fotossintética relativamente a outro tipo de oleaginosas tornam as microalgas uma fonte promissora de matéria-prima para a produção de biodiesel [14].

Embora, numa perspetiva simplista as microalgas possam parecer semelhantes a outras matérias-primas usadas para a produção de biodiesel, estas são micro-organismos vivos

que se desenvolvem essencialmente em ambientes líquidos e portanto, têm técnicas particulares de cultivo, colheita e processamento que devem ser consideradas, de modo a permitir produzir mais eficientemente o biodiesel [11].

### 3.2. Etapas do processo

As etapas do processo de produção de biodiesel a partir de microalgas encontram-se esquematizadas na Figura 1 e incluem: a seleção das microalgas e do local de cultivo, o cultivo de microalgas, a sua colheita, extração de lípidos e sequente transesterificação. Cada passo será explicado sucintamente de seguida.

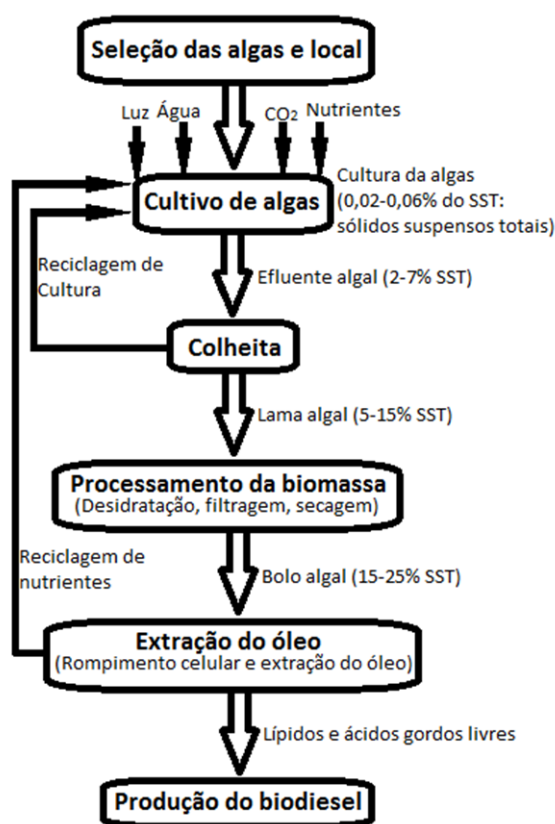


Figura 1 Etapas do processo de produção de biodiesel a partir de óleo de microalgas (adaptado de [11]).

#### 3.2.1. Seleção das microalgas e do local de cultivo

As microalgas estão presentes em todos os ecossistemas existentes no nosso planeta, não só aquáticos mas também terrestres, representando uma grande variedade de espécies vivas que se desenvolvem numa ampla gama de condições ambientais. Estima-se que existam

mais de 50.000 espécies diferentes, mas apenas um número limitado (cerca de 30.000) foram já objeto de estudo e análise [11].

Na Tabela 2 referem-se algumas espécies de microalgas já estudadas e referidas com frequência na literatura, quantificando o seu teor lipídico, produtividade lipídica, produtividade volumétrica de biomassa e a produtividade de biomassa por área.

**Tabela 2 Teor lipídico, produtividade de lípidos e de biomassa de diferentes espécies (adaptado de [11].**

Espécie de microalgas	Teor de lípidos (% de peso seco da biomassa)	Produtividade lipídica (mg / L / dia)	Produtividade volumétrica de biomassa (g / L / dia)	Produtividade areal de biomassa (g / m <sup>2</sup> / dia)
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	24.0 – 31.0	–	–	11.5 – 17.4
<i>Botryococcus braunii</i>	25.0 – 75.0	–	0.02	3.0
<i>Chlorella emersonii</i>	25.0 – 63.0	10.3 – 50.0	0.036 – 0.041	0.91 – 0.97
<i>Chlorella vulgaris</i>	5.0 – 58.0	11.2 – 40.0	0.02 – 0.20	0.57 – 0.95
<i>Dunaliella salina</i>	6.0 – 25.0	116.0	0.22 – 0.34	1.6 – 3.5/20 – 38
<i>Dunaliella primolecta</i>	23.1	–	0.09	14
<i>Haematococcus pluvialis</i>	25.0	–	0.05 – 0.06	10.2 – 36.4
<i>Scenedesmus sp.</i>	19.6 – 21.1	40.8 – 53.9	0.03 – 0.26	2.43 – 13.52

A *Chlorella* parece ser uma boa opção para a produção de biodiesel. No entanto, há outras espécies tão eficientes e produtivas como esta, como se pode observar na Tabela 2. A seleção das espécies mais adequadas necessita de tomar em consideração outros fatores tais como, por exemplo, a capacidade das microalgas se desenvolverem usando os nutrientes disponíveis ou em condições ambientais específicas. Todos estes parâmetros devem ser considerados simultaneamente, na seleção das espécies mais adequadas para a produção de biodiesel [11].

### 3.2.2. Cultivo

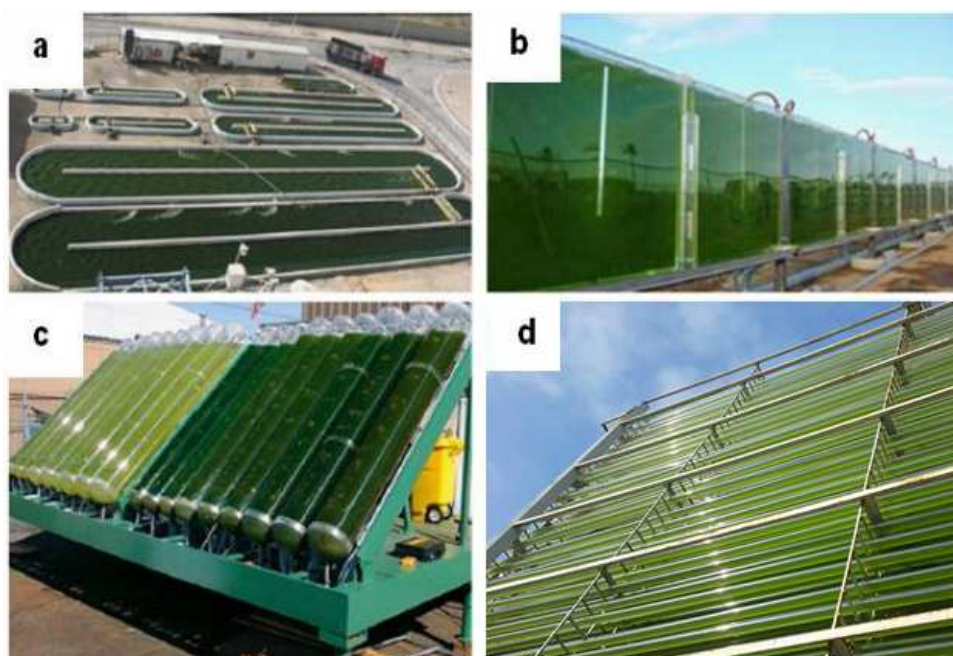
As microalgas podem ser cultivadas tanto em sistemas de cultura abertos como em sistemas de cultura fechados (denominados fotobiorreatores) (Figura 2).

Os sistemas de cultura abertos podem ser classificados em águas naturais (lagos) e lagoas

artificiais. Os sistemas mais usados incluem grandes lagoas rasas, tanques e lagos circulares (*raceway ponds*). Uma das principais vantagens dos tanques abertos é o facto de serem mais fáceis, económicos de construir e operar do que os sistemas fechados. No entanto, as suas principais limitações incluem a utilização de pouca luz pelas células, perdas de água por evaporação, difusão de CO<sub>2</sub> para a atmosfera e a exigência de grandes áreas de terreno. Além disso, há uma maior probabilidade de contaminação por outros seres heterotróficos de rápido crescimento, restringindo assim, a produção comercial de microalgas em sistemas de cultura aberta, sendo estes sistemas adequados apenas aos organismos que podem crescer em condições extremas. Além disso, devido aos mecanismos de agitação ineficiente em sistemas de cultivo abertos, as taxas de transferência de massa são muito baixas resultando em baixa produtividade de biomassa. A Tabela 3 resume as vantagens e limitações da utilização de lagoas abertas [15].

Um fotobiorreator é um dispositivo técnico fechado, concebido para produzir microrganismos fotossintéticos, em colaboração com os requisitos ótimos de luz, de temperatura, de pH, de meio, de transferência de quantidade de movimento e de CO<sub>2</sub> [10].

Os fotobiorreatores podem tomar várias formas, tais como: colunas verticais, placas planas e tubos inclinados ou horizontais [15], como se mostra na Figura 2.



**Figura 2** Reatores utilizados no cultivo de microalgas: (a) lagoas abertas e fotobiorreatores (b) placa plana, (c) tubos inclinados [16] e (d) tubos horizontais [17].



Na Tabela 3 resumem-se as vantagens e limitações de alguns tipos de sistemas de cultivo.

**Tabela 3 Vantagens e limitações dos diversos sistemas de cultura de algas [15].**

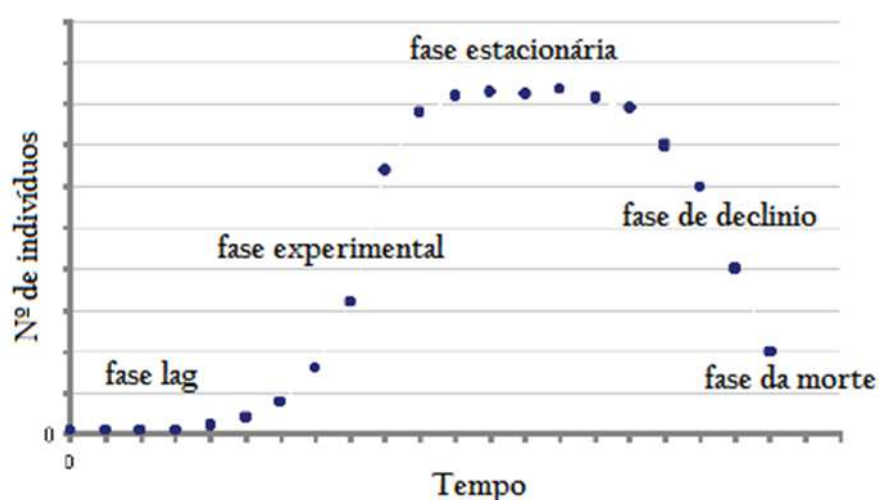
Sistema de Cultura	Vantagens	Limitações
Tanques abertos	Relativamente económico, fácil de limpar depois do cultivo, bons para cultivo de algas em massa.	Reduzido controlo das condições de cultivo, dificuldade no crescimento de culturas de algas por longos períodos, baixa produtividade, ocupam grande área de terreno, limitado a algumas espécies de algas, as culturas são facilmente contaminadas.
Fotobiorreatores de coluna vertical	Transferência de massa alta, uma boa mistura com baixa tensão de cisalhamento, baixo consumo de energia, alto potencial de escalabilidade, fácil de esterilizar, prontamente temperado, bom para imobilização de algas, fotoinibição e foto-oxidação reduzidas.	Área de superfície de iluminação pequena, construção exige materiais sofisticados, tensão de cisalhamento para culturas de algas, diminuição da área de superfície de iluminação quando é feito o <i>scale-up</i> .
Fotobiorreatores de placa plana	Área de superfície de iluminação grande, adequado para as culturas ao ar livre, bom para imobilização de algas, bom encaminhamento da luz, boa produtividade de biomassa, relativamente barato, fácil de limpar, prontamente temperado, baixa acumulação de oxigénio.	Quando é feito o <i>scale-up</i> , requerem muitos materiais e compartimentos de apoio, dificuldade em controlar a temperatura da cultura, algum grau de crescimento na parede, possibilidade de <i>stress</i> hidrodinâmico para algumas estirpes de algas.
Fotobiorreatores tubulares	Área de superfície de iluminação grande, adequado para as culturas ao ar livre, muito boa produtividade de biomassa, relativamente barato.	Gradiente de pH, oxigénio dissolvido e CO <sub>2</sub> ao longo dos tubos, incrustação, algum grau de crescimento na parede, requer grande espaço de terreno.

Segundo *Chisti* [18], mesmo que o custo associado à construção dos fotobiorreatores seja cerca de dez vezes superior ao dos sistemas abertos, esse custo é compensado pela maior produtividade de biomassa e por uma maior concentração celular numa mesma área de cultivo, como se demonstra na Tabela 4. Desta forma, consegue-se uma maior produção por área ocupada (produção areal), conseguindo-se assim obter uma economia de energia utilizada na colheita [11].

**Tabela 4** Comparação de produtividade obtida em fotobiorreatores e sistemas abertos (adaptado de [8]).

Variável	Fotobiorreator	Lagoa <i>raceway</i>
Produção anual de biomassa (kg)	100 000	100 000
Produtividade volumétrica diária (kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	1,535	0,117
Produtividade areal (kg m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> )	0,072	0,035
Concentração de biomassa (kg m <sup>-3</sup> )	4	0,14
Taxa de diluição (d <sup>-1</sup> )	0,384	0,25
Área necessária (m <sup>2</sup> )	5681	7828
Rendimento em óleo (m <sup>3</sup> .ha <sup>-1</sup> )	58,7	42,6
Consumo anual de CO <sub>2</sub> (kg)	183 333	183 333
Geometria do sistema	132 tubos paralelos/ unidade Comprimento: 80 m Diâmetro de tubo: 0,06 m	978 m <sup>2</sup> /lagoa Largura: 12 m Comprimento: 82 m Profundidade: 0,30 m
Número de unidades	6	8

Ao longo do processo de cultivo das microalgas é necessário proceder à avaliação do seu crescimento, para o que é usada a curva de crescimento. Esta é expressa como sendo a relação entre o incremento da biomassa ou aumento do número de indivíduos em função do tempo. Numa cultura em reator fechado e em cultivo descontínuo, a curva de crescimento apresenta cinco fases distintas.



**Figura 3** Curva de crescimento de uma cultura microalgal em reator fechado.

### 3.2.3. Colheita

A etapa de colheita da biomassa de algas é tipicamente uma das mais dispendiosas de todo o processo, podendo representar 20-30% dos custos totais [19]. O custo desta operação é tipicamente elevado porque as frações mássicas de microalgas são geralmente baixas e, as células transportam normalmente cargas negativas e um excesso de matéria orgânica algogénica para manter a sua estabilidade num estado disperso [20], [21]. Desta forma, a escolha da metodologia a ser usada no processo de colheita é um ponto fundamental na produção de biodiesel a partir de microalgas, uma vez que a utilização de tecnologias que consomem elevada quantidade de energia torna o processo de produção de biodiesel economicamente desinteressante [14].

O processo de colheita de microalgas envolve uma ou mais etapas de separação sólido-líquido, como por exemplo, floculação, centrifugação ou filtração [19].

Quando as microalgas são produzidas com o intuito da extração de produtos de alto valor, a colheita é feita por centrifugação [22]. Esta é a principal técnica aplicada na colheita da biomassa de microalgas e regista uma eficiência superior a 95% [20]. Trata-se de um processo rápido que depende apenas das características de sedimentação das células, do tempo de residência na centrifugadora e da profundidade de decantação [23]. Contudo, este processo é demasiado dispendioso quando se trata de produtos de baixo valor, como o óleo como matéria-prima para biocombustíveis, uma vez que consome muita energia devido aos grandes volumes de meio de cultura que precisam de ser processados [22].

O processo convencional de filtração, filtração sob vácuo, adequa-se para a colheita de microalgas relativamente grandes, com tamanho superior a 70  $\mu\text{m}$ , como a *Coelastrum* e a *Spirulina*. No entanto, este processo não pode ser aplicado na colheita de espécies de microalgas que se aproximam das dimensões bacterianas, como a *Scenedesmus* e a *Chlorella*. Desta forma, para a recuperação de pequenas células de algas com dimensões inferiores a 30  $\mu\text{m}$ , a microfiltração e a ultrafiltração (filtração por membranas utilizando pressão hidrostática), representam alternativas tecnicamente viáveis à filtração convencional [23].

Quanto à floculação é um processo no qual as partículas dispersas são agregadas em conjunto para formar partículas de grandes dimensões para a solução. O tamanho aumentado da partícula conduz consequentemente, a uma sedimentação mais rápida. Os

floculantes podem ser orgânicos ou inorgânicos, tais como, cloreto de ferro (III), sulfato de ferro (III) ou sulfato de alumínio. Atualmente, a filtração não é considerada um método adequado para uma recuperação de microalgas barata e sustentável. Estudos recentes aconselham a utilização da autofloculação das células, que pode ocorrer durante a limitação de carbono ou mudanças de pH [24].

Após a colheita, e no caso do processo produtivo sequente estar padronizado, para utilizar a biomassa seca será necessário secar (ex. secagem ao sol) ou desidratar a biomassa (ex: liofilização) [19].

#### **3.2.4. Extração de lípidos**

Os métodos utilizados para extrair lípidos das sementes oleaginosas podem ser aplicados para a extração de óleo das microalgas. Os métodos mais utilizados na extração de lípidos passam pela prensagem e pela extração por co-solventes, podendo ser utilizados em conjunto para uma maior eficiência, podendo atingir os 95% de quantidade de óleo extraído presente na biomassa. O método de prensagem poderá chegar aos 75% de quantidade de óleo extraído presente na biomassa [19], [25], [26], no entanto, apresenta dificuldades devido à reduzida dimensão das células de microalgas que podem escapar facilmente por pequenos orifícios quando são pressionadas.

O conceito em que se baseia a extração por co-solventes consiste no facto de determinados compostos terem mais afinidade para uns solventes do que para outros. A separação torna-se possível uma vez que o solvente orgânico e o álcool usados se separam em fases diferentes por adição de água [27]. Vários métodos têm sido utilizados para este fim, como a extração direta com hexano ou pelo método de *soxhlet* [28], o método de *Bligh e Dyer* [26] com uma mistura de clorofórmio/metanol como solvente e a extração por fluido (como CO<sub>2</sub> ou metanol) em condições supercríticas [29].

A metodologia de *Bligh e Dyer* é uma versão simplificada do procedimento clássico proposto por *Folch* [25], que se distingue por ser um dos procedimentos de extração mais versátil e efetivo, particularmente adequado para a análise de lípidos nas microalgas.

Embora o protocolo de extração lipídica clássica de *Folch*, baseado na extração com clorofórmio, seja particularmente adequado para a análise de lípidos nas microalgas, existem solventes orgânicos alternativos que são mais seguros e fáceis de utilizar quando

se pretendem aplicar em grande escala. O hexano é menos eficiente que o clorofórmio, mas é também substancialmente menos tóxico, menos dispendioso e, aparentemente apresenta uma grande seletividade para frações lipídicas neutras [21]. Por estes motivos, o hexano tem sido o solvente de eleição nas aplicações em grande escala [11].

### 3.2.5. Transesterificação

De acordo com os requisitos da Norma Europeia EN 14214 [30] (relativa à avaliação da qualidade do biodiesel) deve-se avaliar qualitativamente o óleo extraído de microalgas ou até mesmo de outros produtos vegetais, antes de submeter o óleo à transesterificação. É importante realizar esta avaliação, dado que as percentagens de ácidos gordos relativos aos lípidos totais, da matéria-prima (óleo), podem determinar se o biodiesel produzido a partir daquele óleo vai ter qualidade aceitável ou não.

Os ácidos gordos e ésteres metílicos de ácidos gordos com quatro ou mais ligações duplas entre átomos de carbono da cadeia principal são suscetíveis de oxidação e este facto reduz a sua aceitabilidade na produção ou quando presentes no biodiesel. Os ácidos gordos polinsaturados, com duas ou três ligações duplas entre átomos de carbono são mais estáveis à oxidação do que os anteriores (quatro ou mais ligações duplas). O teor de ésteres metílicos dos ácidos gordos polinsaturados é limitado na Norma EN 14214 [30], e podemos referir que, o limite superior de teor em éster metílico do ácido linolénico (C18:3 n-3) é de 12% (mol) e o limite superior de teor em ésteres metílicos com quatro ou mais ligações duplas é de 1% (mol).

Na Tabela 5 apresentam-se as composições percentuais em alguns tipos de ácidos gordos presentes na *Chlorella vulgaris*. Com a análise da Tabela 5, podemos constatar que a *Chlorella vulgaris* é particularmente rica em ácidos gordos C16:0, C18:1 n-9, C18:2 n-6 e C16:1 n7, sendo uma fonte importante de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) do tipo omega-3 (n-3).

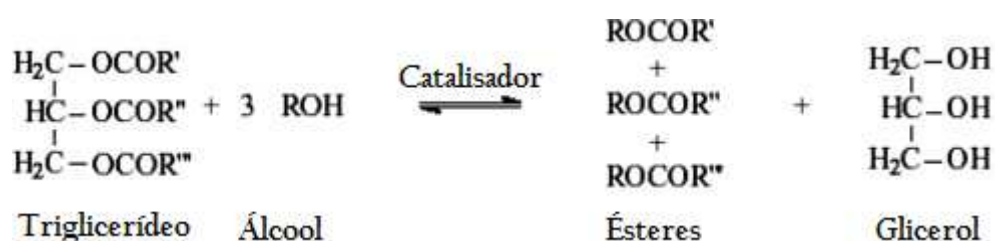
A possibilidade de utilizar óleos vegetais como combustível é reconhecida desde o início dos motores a diesel. Mas, óleo vegetal é demasiado viscoso para uso direto nos motores. Existem algumas técnicas para reduzir a viscosidade do óleo vegetal tais como: a diluição, a microemulsão, a pirólise e a transesterificação, sendo a última a mais utilizada [31].

**Tabela 5 Composição (% mássica) em ácidos gordos, com cadeias de 14 a 22 átomos de carbono, da espécie *Chlorella vulgaris* [32].**

Ácido gordo	Composição em ácidos gordos (%m/m) na <i>Chlorella vulgaris</i>
C14:0	0,38
C14:1	Tr
C16:0	15,41
C16:1n-7	1,17
C18:0	6,24
C18:1n-9	33,14
C18:1n-7	1,13
C18:2n-6	9,73
C18:3n-6	Tr
C18:3n-3	1,93
C18:3n-3	Tr
C20:0	0,19
C20:4n-6	Tr
C20:5n-3	3,23
C22:5n-3	3,11
C22:6n-3	20,94

Tr – quantidades vestigiais

A transesterificação é um processo químico simples que envolve a reação reversível dos triglicéridos com um álcool, na presença de um catalisador (Figura 4). Os produtos desta reação são os ésteres alquílicos de ácidos gordos (biodiesel) e a glicerina (também conhecida como glicerol) é obtida como principal subproduto [33].



**Figura 4 Reação de transesterificação (adaptado de [31]).**

A transesterificação requer 3 moles de álcool por cada mole de triglicéridos, para produzir 1 mole de glicerol e 3 moles de ésteres metílicos (Figura 4). Para que a reação se realize em grande extensão e o equilíbrio seja deslocado na direção da produção dos ésteres metílicos, ou seja, do biodiesel, os processos em grande escala usam 6 moles de metanol para cada mole de triglicéridos, procedendo-se no final da reação à recuperação do excesso

de álcool usado. O rendimento em ésteres metílicos excede 98% em relação ao peso do óleo original [8].

### 3.3. Custo do biodiesel

O biodiesel produzido através de óleo de microalgas pode assumir diferentes valores consoante os métodos utilizados para a sua produção. *Chisti* [8] refere que a recuperação de óleo a partir da biomassa de microalgas e a conversão do óleo em biodiesel não são afetadas pelo facto de a biomassa ser produzida em *raceways* ou fotobiorreatores. Assim, o custo de produção da biomassa é o único fator relevante para uma avaliação comparativa dos fotobiorreatores e *raceways* para a produção de biodiesel de microalgas.

Segundo *Chisti* [8], o preço do óleo extraído da biomassa microalgal produzida nos fotobiorreatores ronda os \$ 2,80/L. Assim pode-se assumir, comparando os valores da Tabela 6 que o processo de colheita/extração do óleo contribui cerca de 50% para o custo final. Em comparação com isto, ao longo de 2013 (de janeiro a junho), o óleo de palma, que é provavelmente o óleo vegetal mais barato [8] foi vendido por um preço médio de \$ 770,61/t ou cerca de \$ 0,86/L [34].

**Tabela 6** Comparação do preço da biomassa produzida em fotobiorreatores e *Raceways* (adaptado de [8]).

	<b>Fotobiorreator</b>	<b><i>Raceway</i></b>
Preço do kg de biomassa de microalgas	\$ 2,95	\$ 3,80
(Aumento de produção para 10 000t)	Devido à economia de escala o preço desce;	
Preço do kg de biomassa de microalgas	\$ 0,47	\$ 0,60
Biomassa para fornecer 1 litro de óleo.	Assumindo que a biomassa contém 30% de óleo em peso;	
	\$ 1,40	\$ 1,81

Comparando o preço do óleo, podemos constatar que a produção de biodiesel através de microalgas é bastante mais cara do que a produção de biodiesel convencional. Note-se que o preço de óleo de microalgas acima descrito é relativo ao ano 2006, e o preço do óleo de palma é de 2013, o que pode alterar um pouco os valores apresentados, mas não deverá andar muito longe da realidade.

Para que o óleo de microalgas possa substituir o petróleo como fonte de hidrocarbonetos para a indústria petroquímica, o óleo terá que ser obtido a um preço que é aproximadamente relacionado com o preço do petróleo bruto, através da equação (1) [8]:

$$C_{\text{óleo de algas}} = 6,9 \times 10^{-3} \times C_{\text{petróleo}} \quad (1)$$

Onde  $C_{\text{óleo de algas}}$  (\$ por litro) é o preço do óleo de microalgas e  $C_{\text{petróleo}}$  é o preço do petróleo, em \$ por barril. A equação (1) assume que o óleo de algas tem cerca de 80% do conteúdo energético do petróleo.

Segundo *Zardo* [35], o custo de produção do biodiesel a partir de óleo de microalgas cultivadas em fotobiorreatores tubulares verticais, fotobiorreatores tubulares horizontais e lagoas tipo *raceway* é \$ 1,43, \$ 1,64 e \$ 10,65 /L, respetivamente. Comparando com o preço do biodiesel convencional apresentado, de \$ 1,03/L<sup>1</sup>, com os resultados acima descritos, *Zardo* concluiu que o biodiesel de microalgas não é economicamente viável.

Tendo em mente os resultados anteriormente obtidos por vários autores e já referidos, optou-se por estudar com mais detalhe a etapa de colheita das microalgas (*Chlorella vulgaris*), de modo a otimizá-la e então avaliar o custo da produção de biodiesel a partir do óleo extraído desta microalga.

---

<sup>1</sup> A conversão de Real para Dólar US foi realizada à taxa do dia 14-08-2013 por [36].



## 4. Trabalho experimental

Neste capítulo serão abordadas as técnicas e procedimentos experimentais utilizados para obtermos os resultados necessários à avaliação dos custos de produção das microalgas e do óleo extraído.

### 4.1. Escolha da microalga

A microalga escolhida para este estudo foi a *Chlorella vulgaris*. Esta escolha deve-se ao facto de esta espécie ser de rápido crescimento, resistente e muito comum nos ambientes aquáticos nacionais. Por outro lado, é uma espécie com boa produtividade lipídica, com cerca de 13,3 % de lípidos (% peso seco) [32]. Apesar da prevalência desta microalga nos ambientes nacionais, a estirpe utilizada foi a SAG 211.12, adquirida de entre a coleção da Algoteca SAG (*Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen – Culture Collection of Algae*).

A *Chlorella vulgaris* é uma microalga do Reino Protista e Filo *Chlorophyta* (algas verdes). As microalgas que pertencem a este Filo têm como pigmentos fotossintéticos predominantes a clorofila *-a* e *-b*, os quais estão localizados em plastos [37]. Esta espécie habita em meios de água doce e é uma microalga imóvel (sem flagelos), unicelular (não colonial), sem constrição mediana (sinus) e de forma celular esférica, de 2-10 µm de diâmetro [38].

## 4.2. Cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*

Numa fase inicial, o cultivo da *Chlorella vulgaris* foi efetuado em fotobiorreatores que consistiam em *erlenmeyers* de 1 L e posteriormente em *erlenmeyers* de 5 L, a partir de uma cultura densa obtida por inoculação de tubos de ensaio com a estirpe original, SAG 211.12. Por fim, quando a cultura atingiu densidade elevada e robustez necessária para resistir a contaminações, foram realizados cultivos em aquários de 30 L. As culturas foram preparadas e mantidas em regime descontínuo.

### 4.2.1. Preparação do material

Todo o material utilizado (*erlenmyeres*, pipetas, provetas, tubos de ensaio, etc.) foi previamente lavado em água corrente e detergente, passado por água destilada, autoclavado a 121 °C durante 20 min em autoclave (Memmert) e colocado em câmara de fluxo laminar (Cruma 870-FL, Figura 5) sob radiação UV durante 20 min.



**Figura 5** Câmara de fluxo laminar Cruma 870-FL

Devido à baixa resistência a elevadas temperaturas, das rolhas de borracha dos *erlenmeyeres* e dos tubos de arejamento de silicone, estes foram sujeitos apenas a uma

fervura a 100 °C, durante 10 min, em vez de autoclavagem. Posteriormente foram colocados na câmara de fluxo laminar (Cruma 870-FL) sob radiação UV durante 20 min.

#### 4.2.2. Preparação do meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi o BBN 3N modificado, cuja composição se encontra descrita na Tabela 7. Todos os reagentes usados neste trabalho são de qualidade p.a.

**Tabela 7 Composição do meio BBM 3N modificado.**

Reagente		C <sub>mássica</sub> (g/L <sub>conc.</sub> )	Toma para volume 1 L (mL)
Macronutriente	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	15,00	10
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	35,00	10
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	15,00	5
	NaNO <sub>3</sub>	75,00	30
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	5,00	5
	NaCl	5,00	5
	EDTA-Na <sub>2</sub> + KOH	50,00 + 31,00	1
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O+H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,98 + 1,00 mL	2
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,42	1
Micronutriente	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,412	0,5
	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,232	
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,252	
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,080	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,192	
H <sub>2</sub> O	–	–	930

Este meio tem como base o meio BBM (*Bold Basal Medium*, UTex) que é o meio de cultura padrão utilizado para cultivo de *Chlorella vulgaris*. As alterações do meio BBM 3N modificado, relativamente ao meio padrão BBM convencional são as seguintes: a concentração de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> foram duplicadas, passando de 7,50 g/L<sub>conc</sub> para 15,00 g/L<sub>conc</sub> e de 17,50 g/L<sub>conc</sub> para 35,00 g/L<sub>conc</sub>, respetivamente. Também há uma alteração na concentração do FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, aumentando o volume usado na preparação do meio para o dobro, passando de 0,5 mL para 1,0 mL. A maior alteração do meio BBM 3N modificado relativamente ao meio BBM convencional é no reagente NaNO<sub>3</sub>, o qual é adicionado numa quantidade seis vezes superior à do meio padrão. Essa alteração foi efetuada aumentando

três vezes a concentração de 25,00 g/L<sub>conc</sub> para 75 g/L<sub>conc</sub> e três vezes o volume por litro passando de 10 mL para 30 mL. Ainda se reduziu, para metade, o volume de micronutrientes acrescentado por litro de cultura, passando de 1,0 ml para 0,5 mL. Por fim, acertou-se o volume com água até perfazer 1 litro, que neste caso corresponde a 930 mL.

Para evitar contaminações, o meio deveria ser autoclavado mas, devido a dificuldades na utilização de uma autoclave, foi colocado em câmara de fluxo laminar (Cruma 870-FL) sob radiação UV durante 20 min, antes da inoculação.

#### 4.2.3. Inoculação

Numa fase inicial da inoculação, as culturas foram inoculados em *erlenmyeres* de 1 L e posteriormente de 5 L, com condições de luz e temperatura controladas. Estes parâmetros foram assegurados por exposição a iluminação artificial, proveniente de lâmpadas fluorescentes, com um foto período de 12:12 horas e posicionados com a ajuda de um luxímetro (Lutron LX-1102) para que a intensidade luminosa se mantivesse constante a 3500 lux. A temperatura na sala de cultivo foi controlada com um sistema de ar condicionado portátil com bomba de calor (Orbegozo ADR-67), e mantida aproximadamente à temperatura ambiente (24 °C).

A inoculação das culturas, tanto de 1 L como de 5 L, foi efetuada em câmara de fluxo laminar (Cruma 870-FL). A monitorização de crescimento das microalgas nos *erlenmyeres* foi efetuada com controlo visual, através da coloração apresentada. A Figura 6 evidencia as alterações da coloração das culturas ao longo do tempo.



**Figura 6** Culturas de *Chlorella vulgaris* em *erlenmeyers* de 1L. À esquerda: dia 0 da inoculação; à direita: identificação da cultura que está pronta a inocular *Erlenmeyers* de 5 L.

Como podemos ver na Figura 6 a cultura identificada com a seta, apresenta uma coloração verde forte. Desta forma conseguimos identificar a altura apropriada para inocular em *Erlenmeyers* de 5 L. O mesmo processo foi utilizado para passar das culturas de 5 L para a cultura em aquário de 30 L.

O cultivo de microalgas em aquários de 30 L foi efetuado em regime não controlado de luz, temperatura ou contaminações. Os meios de cultura não foram previamente esterilizados. As culturas foram sujeitas apenas a luz natural e às variações naturais e sazonais de luz e de temperatura.

O controlo de crescimento nesta fase foi efetuado pelo método da densidade ótica, que consiste na monitorização da absorvância das culturas a partir de 3 mL de amostra da suspensão de microalgas, tomando como referência o meio de cultura, num espectrofotómetro UV/Visível (Shimadzu UV-160 A) (Figura 7). Quanto maior for o número de células, maior será a absorvância, traduzindo um aumento da densidade ótica. As leituras realizaram-se a um comprimento de onda de 683,5 nm, correspondente ao pico de absorvância máxima determinado para a cultura mãe de *Chlorella vulgaris*. A relação entre a densidade ótica a um determinado comprimento de onda,  $\lambda$ , ( $OD_{\lambda}$ ) e a concentração em biomassa seca ( $C_b$ , g/L) foi estabelecida para o comprimento de onda  $\lambda = 683,5$  nm e pode ser representada pela equação:  $C_b = (OD_{683,5} - 0,0337) / 2,696$  (Anexo A).



**Figura 7** Espectrofotómetro Shimadzu UV-160 A, usado na avaliação da densidade ótica.

#### **4.3. Processo de colheita das microalgas**

Conforme referido anteriormente, este passo é tipicamente um dos mais dispendiosos, representando 20 a 30 % dos custos totais. Assim, foram estudados técnicas alternativas de

colheita, tendo em vista a diminuição dos custos associados a esta etapa, tornando o processo energética e economicamente mais eficiente.

#### **4.3.1. Aumento do pH**

Segundo Wu [39], o aumento do valor do pH do meio induz a uma maior eficiência de floculação, até 90 % para as microalgas de água doce. Para o aumento do pH da cultura de *Chlorella vulgaris* utilizou-se uma solução concentrada do reagente NaOH, que foi adicionado a uma amostra de cultura, cujo pH inicial era de 6,7 com uma absorvância de 0,120. Aumentou-se o pH de 8 a 13, em incrementos sucessivos, efetuando-se as respectivas leituras óticas de absorvância de 15 em 15 min, até um máximo de 90 min (Anexo C).

#### **4.3.2. Adição de Flocculante**

O flocculante utilizado foi o Pax XL-10 (Solução de poli-hidroxiclorsulfato de alumínio, comercializado pela Quimitécnica) que é utilizado na floculação primária de águas. O procedimento para flocular as microalgas foi o seguinte:

- a) Retirou-se do aquário cerca de 1800 mL de cultura;
- b) Mediu-se o pH, a temperatura e a absorvância da cultura;
- c) Da cultura retirada do aquário, mediram-se 300 mL para cada um de seis gobelés;
- d) Cada gobelé foi numerado de 1 a 6, sendo o número de cada gobelé o volume em mL de Pax XL-10 adicionado;
- e) As seis culturas foram colocadas num sistema *Jar-test* (ISCO – JF/6) (Figura 8), em agitação rápida durante 15 min a 25 rpm e, posteriormente ficaram 15 min em repouso para formar e depositar os flocos de microalgas;
- f) Por fim, foram colhidos os sobrenadantes das amostras mais satisfatórias e medida a temperatura, o pH e a absorvância.

O processo anterior foi repetido, mas para uma gama de volumes de Pax XL-10 menor. Os volumes adicionados foram: 0,30 mL, 0,60 mL, 0,90mL, 1,20 mL e 1,50 mL.



**Figura 8 – Sistema *Jar-test* ISCO – JF/6, usado nos ensaios de floculação.**

#### **4.4. Extração de óleo por solvente**

Nesta etapa do processo foram utilizados dois métodos para extração de óleos. O primeiro método foi o de *Bligh and Dyer* [26] modificado, que foi usado para quantificar o óleo produzido e acumulado na *Chlorella vulgaris*, em amostras de pequena dimensão. O segundo foi o método de *Halim* [28], que foi usado para extrair o óleo em maior escala.

##### **4.4.1. Extração pelo método de *Bligh and Dyer***

- a) Pesou-se biomassa húmida num tubo de vidro utilizável na centrífuga;
- b) Adicionou-se os solventes na proporção (1:2:0,8 (v/v)), respetivamente, clorofórmio, metanol e água (uma vez que a biomassa é húmida não se adicionou água, apenas se quantificou a água contida na biomassa);
- c) Agitação da mistura em tubos fechados com tampa, em vortex (Snijders 34524), a velocidade moderada, durante cerca de 5 min;
- d) Levou-se ao aparelho de ultrassons (Baldelin Sonorex TK30) durante 30 min;
- e) Adicionou-se os solventes na proporção (2:2:1,8 (v/v)), respetivamente, clorofórmio, metanol e água;
- f) Agitação da mistura em tubos fechados com tampa, em vortex (Snijders 34524), a velocidade moderada, durante cerca de 5 min;
- g) Levou-se novamente ao aparelho de ultrassons (Baldelin Sonorex TK30) durante 30 min;
- h) Centrifugou-se a 3000 rpm durante 15 min (centrifuga ECCO Tvp 25 Nr 8601) (no final desta etapa há a formação de 3 fases bem distintas: a superior, rica em água e

metanol; a intermédia, constituída por biomassa e, a inferior, composta por clorofórmio e lípidos) (Figura 9);

- i) Descartou-se a fase superior;
- j) Recuperou-se a fase inferior para um tubo de ensaio previamente pesado;
- k) Evaporou-se o clorofórmio (ao ar);
- l) Pesou-se o tubo para quantificação dos lípidos recuperados.



**Figura 9** Fases após a extração de lípidos pelo método de *Bligh and Dyer*.

#### **4.4.2. Extração pelo método de *Halim***

- a) Pesou-se a biomassa húmida num frasco de vidro;
- b) Adicionou-se à amostra os co-solventes hexano e isopropanol, na proporção 3:2 (v/v), respetivamente;
- c) Levou-se a mistura resultante ao banho de ultrassons, durante 1 h;
- d) Adicionou-se 198 mL de água e 200 mL de isopropanol (observou-se a formação de um sistema bifásico) (Figura 10);
- e) Colocou-se a mistura num funil de decantação e recolheu-se a fase superior, onde se encontram a maior parte dos lípidos extraídos;
- f) Por fim, procedeu-se à destilação da mistura recolhida, separando o óleo extraído do hexano.





Figura 10 Fases observadas na extração de lípidos pelo método de *Halim*.

#### 4.5. Produção de biodiesel a partir do óleo extraído da *Chlorella vulgaris*

Neste processo foram utilizados dois métodos para produção de biodiesel. O primeiro foi o método de *Lepage* e *Roy* modificado [40] (reação de esterificação), que foi utilizado para quantificar o biodiesel produzido com uma determinada quantidade de óleo. O segundo método foi a transesterificação e foi utilizado para produzir biodiesel em maior escala.

##### 4.5.1. Método de *Lepage* e *Roy* [40] modificado (reação de esterificação)

Este método baseia-se na reação de esterificação dos ácidos gordos, catalisada por um ácido forte, neste caso o ácido sulfúrico.

- a) Redissolveram-se os lípidos extraídos num tubo de vidro com tampa de roscar: para 10 mg de óleo, adição de 2 mL de uma mistura de clorofórmio/metanol nas proporções de (2:1, v/v), respetivamente;
- b) Adicionou-se metanol e ácido sulfúrico 95-97 %, reagente e catalisador de esterificação, respetivamente: para 10 mg de óleo, adição de 1 mL de metanol e 0,3 mL de ácido sulfúrico. Adicionou-se a quantidade adequada à massa de óleo disponível;
- c) Agitou-se vigorosamente durante 5 min. (Enroscou-se a tampa para a agitação ser mais eficiente);
- d) Pesou-se o tubo com a mistura;

- e) Procedeu-se à reação durante 10 min a 100 °C, num digestor Thermoreactor Velp Scientifica, ECO 16;
- f) Adicionou-se 1 mL de água para separar as fases (nesta etapa, por adição da água formaram-se duas fases, a superior rica em água, metanol e ácido sulfúrico, e a inferior composta por clorofórmio e ésteres);
- g) Descartou-se a fase superior;
- h) Adicionou-se 1 mL de água para lavagem e remoção do excesso de ácido (separação das fases)
- i) Descartou-se a fase superior;
- j) Adicionou-se 1 mL de água para lavagem;
- k) Filtrou-se a fase inferior com um filtro com poro 0,20 µm (com o auxílio de uma seringa), para remover qualquer partícula que ainda tivesse permanecido na amostra;
- l) Deixou-se evaporar o clorofórmio, ficando os ésteres metílicos no tubo.

#### **4.5.2. Método de transesterificação convencional**

A transesterificação convencional é realizada fazendo reagir o óleo com um álcool (usualmente o metanol) a temperaturas moderadas da ordem dos 60 °C, sendo catalisada por NaOH. O procedimento encontra-se descrito de seguida.

- a) Depois de pesar o óleo obtido num frasco de vidro com tampa de roscar (5,86 g de óleo), misturou-se o metanol (1,172 g) e o NaOH (0,0586 g) num recipiente à parte;
- b) No frasco do óleo adicionou-se a mistura metanol e hidróxido de sódio;
- c) Tapou-se o frasco, agitou-se vigorosamente e colocou-se a mistura no frasco num banho termostaticado a 60 °C com agitação de 500 rpm;
- d) Esperava-se a obtenção de duas fases, a de cima com o biodiesel e a de baixo com o glicerol, o que acabou por não ocorrer.

## 5. Resultados experimentais e discussão

### 5.1. Avaliação do crescimento da *Chlorella vulgaris*

A Figura 11 representa a curva de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*, realizada em aquário de 30 L, sujeita a eventuais contaminações e a variações sazonais de temperatura e luz.

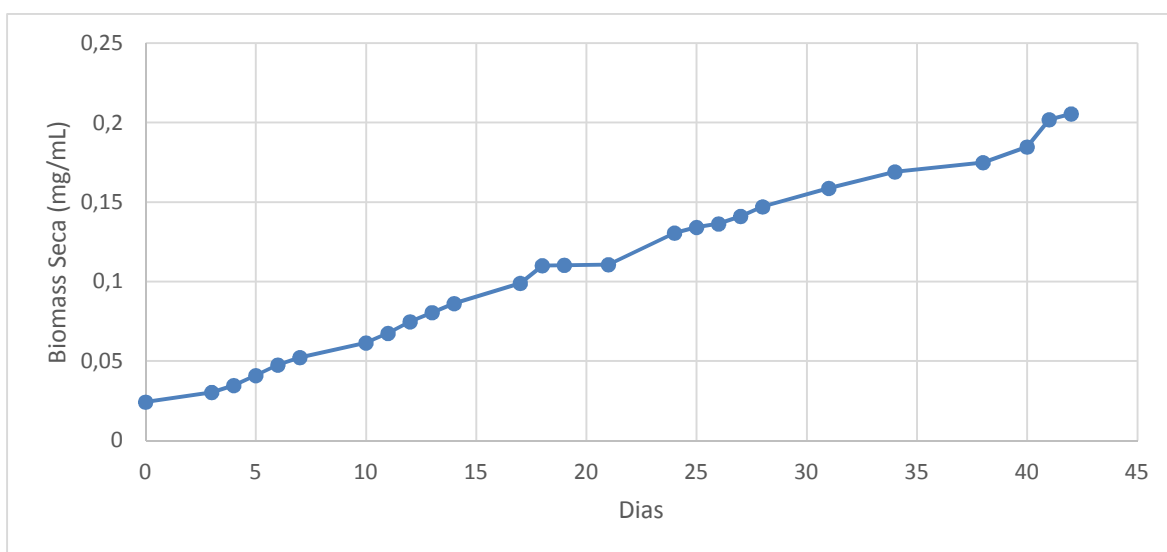


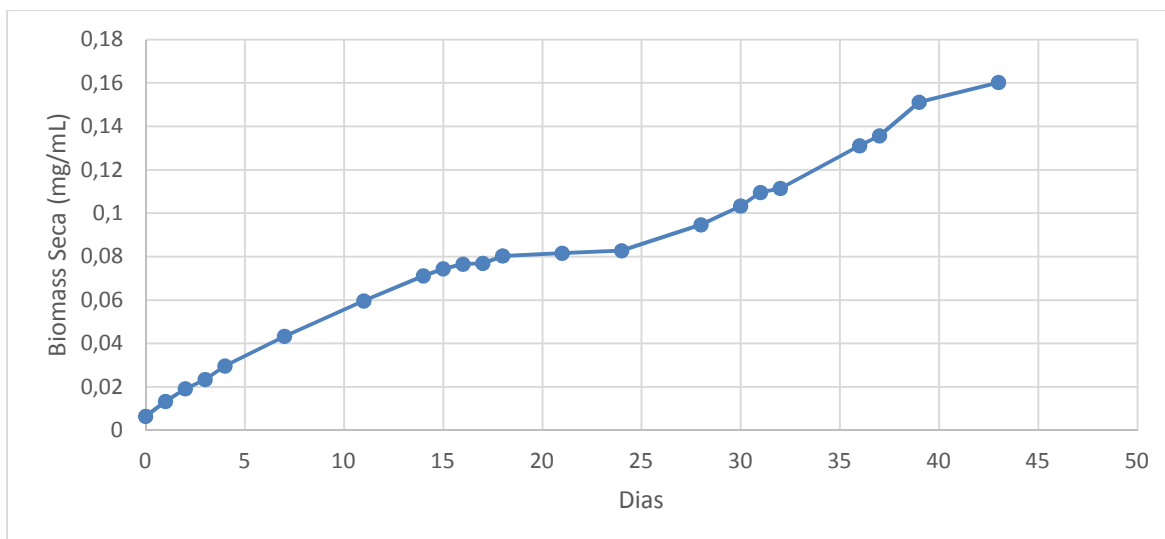
Figura 11 – Avaliação do crescimento da *Chlorella vulgaris* (primeiro aquário 30 L).

Podemos observar, pela análise da Figura 11, que até ao quinto dia o crescimento é mais lento (fase de Indução ou Lag). Segundo *Bertold* [41], a velocidade de crescimento e a produtividade estão diretamente relacionadas com as exigências nutricionais, pH, agitação, temperatura e luz (intensidade e duração da irradiação luminosa). Como a cultura estava sujeita a contaminações e a variações diárias de temperatura e de luz, não sendo a intensidade luminosa suficiente, as restantes fases (Capítulo 3.2.2) não se conseguem identificar uma vez que existem pontualmente variações bruscas de crescimento.



**Figura 12 Cultura em fotobiorreator de 30 L.**

O segundo aquário de trinta litros foi sujeito às mesmas condições que o primeiro. A Figura 13 representa a evolução da concentração de microalgas neste fotobiorreator. Este representa uma curva mais uniforme, embora entre o 16º e o 24º dia tenha estagnado o crescimento, voltando novamente a crescer.



**Figura 13 Avaliação do crescimento *Chlorella vulgaris* (segundo fotobiorreator 30 L).**

Comparando a concentração obtida, passados cerca de 40 dias, podemos observar que no primeiro fotobiorreator a concentração foi cerca de 20 % superior à do segundo.

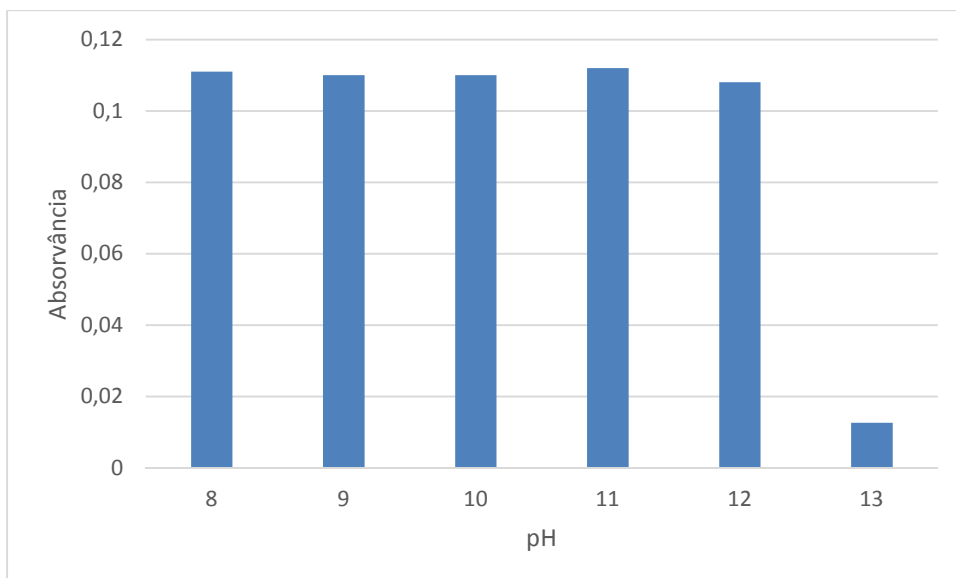
A produtividade em biomassa seca atingida, não é superior a cerca de 5 mg/L/dia, isto é cerca de 25% do valor mínimo referido na Tabela 2 (0,020 g/L/dia). Desta forma confirma-se o efeito das deficientes condições de iluminação e temperatura, visto que os fotobiorreatores se encontravam no interior do laboratório e a luz do Sol não chegava às culturas eficientemente.

## **5.2. Floculação da biomassa algal**

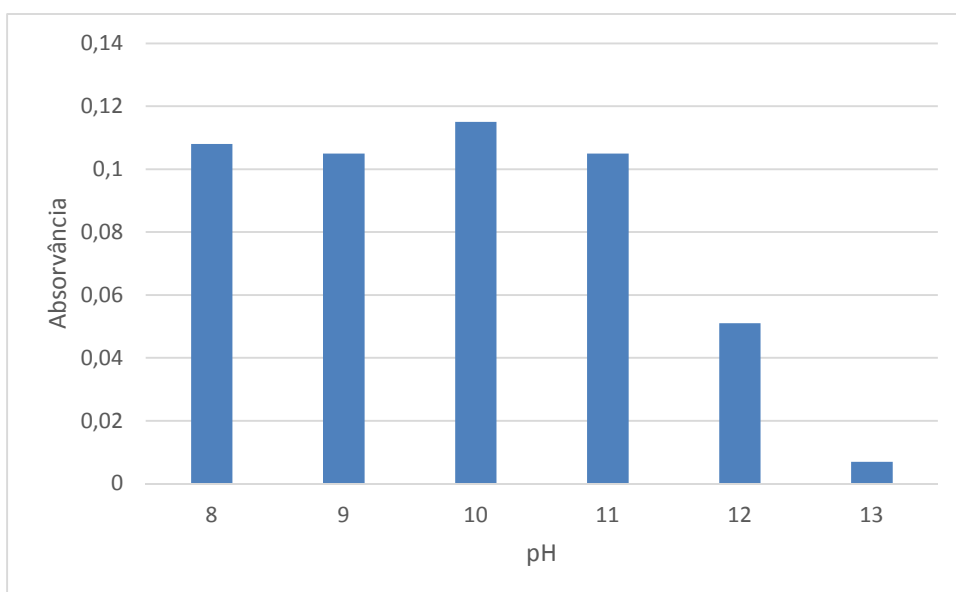
### **5.2.1. Floculação induzida por aumento de pH com NaOH.**

Para a realização deste processo foram retiradas dos fotobiorreatores seis amostras de 300 mL de cultura, com uma densidade ótica de 0,120, avaliada a um comprimento de onda de 683,5 nm.

Após termos adicionado NaOH às amostras conseguimos obter os seguintes resultados com os respetivos tempos (análise pormenorizada Anexo C).



**Figura 14 Absorvância do sobrenadante após 45 min.**



**Figura 15 Absorvância do sobrenadante após 90 min.**

Analisando a Figura 14 e Figura 15 podemos observar que para obtermos resultados minimamente satisfatórios é necessário elevar o pH até cerca de 13, o que se torna extremamente difícil e oneroso a uma escala industrial. Mesmo assim o sobrenadante apresenta alguma biomassa o que nos leva a descartar esta opção para utilização em grande escala.

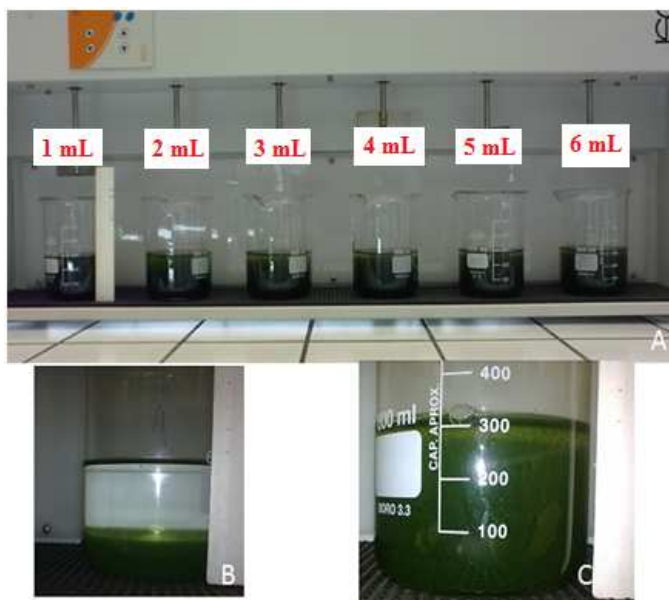


**Figura 16** Cultura após adição de NaOH.

### **5.2.2. Floculação induzida por adição de um flocculante (Pax XL-10)**

Para a realização deste processo foram retiradas 6 amostras de 300 mL de culturas dos fotobiorreatores com uma densidade ótica de 0,494, avaliada a um comprimento de onda de 683,5 nm, com um pH de 6,9 e à temperatura de 22,3 °C.

Este processo foi realizado com a ajuda de um sistema *Jar-test* como mencionado no Capítulo 4.3.2, obtendo-se os resultados visíveis na Figura 17.



**Figura 17 A)** Amostras após a adição de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 mL de Pax XL-10, com agitação durante 15 min a 25 rpm; **B)** Resultados para adição de 1 mL de Pax XL-10, após 60 min de repouso; **C)** Resultado para as restantes adições após 60 min de repouso (resultados todos idênticos).

No final do processo, na amostra onde se adicionou 1 mL de Pax XL-10, obteve-se um sobrenadante completamente límpido, com uma absorvância de 0, com pH de 3,7 e uma temperatura de 24,7 °C.

A adição de 2 a 6 mL de Pax XL-10, não teve qualquer tipo de consequência a nível de floculação, pelo que se assumiu que não deveria ser usado uma proporção Pax XL-10: volume de cultura superior a 1:300.

Na Tabela 8 está representado a evolução do rendimento da colheita da biomassa obtido com a adição de 1 mL de Pax XL-10.

**Tabela 8 Rendimento da colheita com floculação induzida por adição de 1 mL de Pax XL-10.**

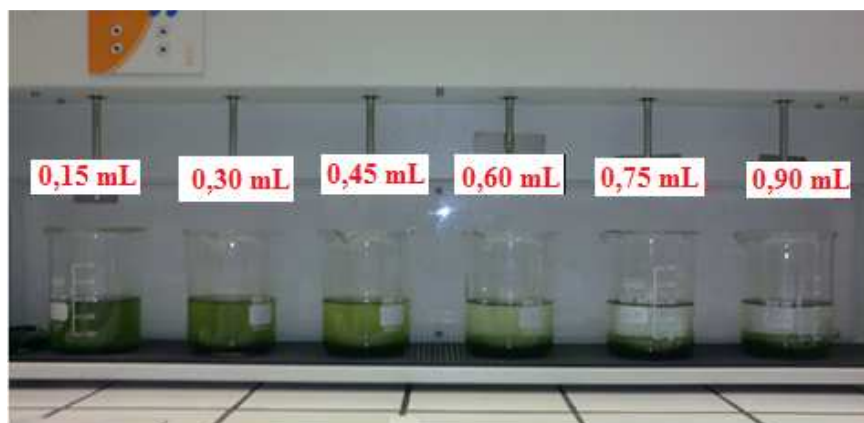
<b>Tempo (min)</b>	<b>Altura (cm)</b>	<b>Volume (mL)</b>	<b>Rendimento %</b>
<b>0</b>	4,2	300,00	0,00
<b>30</b>	0,7	50,00	83,33
<b>60</b>	0,3	21,43	93,00

Como se pode observar na Tabela 8, o rendimento pode ser superior a 90%, como foi referenciado por *Chen* [20].

Para reduzir os custos do processo, limitou-se a escala de adição de floculante entre 0,15 mL e 0,90 ml, em amostras de cultura de 300 mL, com absorvância de 1,280, pH inicial de 9,3 e uma temperatura de 32,2 °C, obtendo-se os resultados visíveis na Figura 18. Foi ainda adicionado 1 mL de floculante a uma amostra com as mesmas condições referidas anteriormente, meramente por motivos de comparação.

Devido a um incidente com o arejamento na cultura que estávamos a trabalhar, foi necessário utilizar uma cultura de reserva que estava em matraz de 5 L, daí a elevada absorvância registada, comparativamente com a absorvância da cultura anterior.





**Figura 18 Resultados após adição de Pax XL-10 nas quantidades indicadas na foto, com agitação rápida a 70 rpm (3 min) + agitação lenta a 25 rpm (15 min) e 60 min de repouso.**

No final do processo, na amostra onde se adicionou 0,75 e 0,9 mL de Pax XL-10, obteve-se um sobrenadante aparentemente límpido, com uma absorvância de 0,004 e 0,000 e com pH de 7,5 e 7,2 a uma temperatura de 27,2 e 27,1 °C, respectivamente. Os restantes ensaios resultaram em menor remoção das microalgas e não satisfizeram o pretendido.

**Tabela 9 Rendimento da colheita de microalgas com adição de 0,75, 0,90 e 1 mL de Pax XL-10.**

**Adição de 0,75 mL de Pax XL-10**

Tempo (min)	Altura do concentrado (cm)	Volume (mL)	Rendimento %
0	4,2	300	0,00
30	0,7	50	83,33
60	0,7	50	83,33

**Adição de 0,90 mL de Pax XL-10**

Tempo (min)	Altura do concentrado (cm)	Volume (mL)	Rendimento %
0	4,2	300	0,00
30	0,3	21,43	92,86
60	0,3	21,43	92,86

**Adição de 1,0 mL de Pax XL-10**

Tempo (min)	Altura do concentrado (cm)	Volume (mL)	Rendimento %
0	4,2	300	0,00
30	0,3	21,43	92,86
60	0,3	21,43	92,86

Analisando a Tabela 9 podemos observar que o melhor rendimento é obtido com a adição de 0,9 e 1 mL de floculante, correspondendo a 92,86% para ambos. Como o objetivo é a rentabilização do processo de extração da biomassa, optou-se como melhor resultado pela adição de 0,9 mL/300 mL cultura, pois com menos floculante e portanto com menos custos, conseguimos resultados satisfatórios.

Após a floculação das microalgas foi recolhido sobrenadante que posteriormente foi sujeito a uma absorção atômica para identificar e quantificar o alumínio chegando-se aos seguintes resultados:

- No sobrenadante da amostra de cultura onde foi adicionado 1 mL de Pax XL-10 o alumínio foi quantificado em 0,944 ppm;
- No sobrenadante da amostra de cultura onde foi adicionado 0,9 mL de Pax XL-10 o alumínio foi quantificado em 1,078 ppm.

### 5.3. Extração de lípidos

Foram usados dois processos de extração de lípidos, um para quantificação e outro para extração de lípidos em grande escala, de acordo com os procedimentos descritos em 4.4.1 e 4.4.2, respetivamente.

#### 5.3.1. Extração de lípidos para avaliação do conteúdo lipídico

Usando o método de *Bligh and Dyer* [26], descrito em 4.4.1, obtivemos os resultados expressos na Tabela 10.

**Tabela 10 Quantidade de lípidos obtidos com aproximadamente 1 g de biomassa húmida.**

Tubo	Massa húmida (g)	Metanol (mL)	Clorofórmio (mL)	30 min banho ultra sons	Clorofórmio (mL)	Água (mL)	Lípidos (g)
1	0,9917	2,36	1,18		1,18	1,18	0,0075
2	0,9999	2,37	1,19		1,19	1,19	0,0078
3	0,9959	2,37	1,18		1,18	1,19	0,0064
4	0,9993	2,37	1,19		1,19	1,19	0,0056

A produtividade lipídica máxima obtida nos ensaios representados na Tabela 10 observa-se no tubo 2, com uma quantidade próxima de 0,0078 g lípidos/g biomassa húmida. Tendo

em conta que a biomassa tem um teor de humidade na ordem dos 80%, isso significa que foram obtidos cerca de 0,039 g lípidos / 1 g biomassa seca.

### 5.3.2. Extração de lípidos em grande escala

Usando o método de *Halim* [28], descrito em 4.4.2, obtivemos os resultados expressos na Tabela 11.

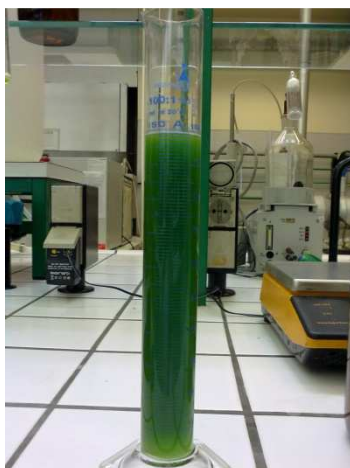
**Tabela 11 Quantidade de lípidos obtidos pelo método de *Halim***

Massa húmida (g)	Hexano (mL)	Isopropanol (mL)	banho ultra sons (1h)	Hexano (mL)	Água (mL)	Lípidos (g)
174,17	2357,2	1571,5		800	800	5,86

A produtividade lipídica obtida ronda os 0,0336 g lípidos/g biomassa húmida. Sabendo que o teor de humidade é de cerca de 80% a *Chlorella Vulgaris* cultivada, apresenta um teor lipídico de cerca de 0,168 g lípidos/g biomassa seca. Assim temos uma produtividade de óleo de cerca de 0,823 mg lípidos/L<sub>cultura</sub>/dia. A *Chlorella vulgaris*, segundo a Tabela 11 um teor lipídico de 16,8% em biomassa seca.

Neste processo, para uma melhor rentabilidade, fez-se a recuperação do hexano com destilação, conseguindo-se recuperar cerca de 93,12% do hexano utilizado. Tendo em conta que o nosso processo de destilação não era dos mais eficientes, podemos dizer que com um processo de destilação mais eficiente, poderemos chegar a perdas de hexano na ordem dos 5%.

Na extração dos lípidos observou-se que a água e o isopropanol obtidos após a extração dos lípidos, apresentavam uma coloração verde bastante intensa (Figura 19), o que indica uma elevada quantidade de clorofila que poderá ser recuperada e utilizada como produto de valor acrescentado.



**Figura 19** Água e isopropanol recuperados após a extração dos lípidos.

#### **5.4. Esterificação e Transesterificação do óleo de microalgas**

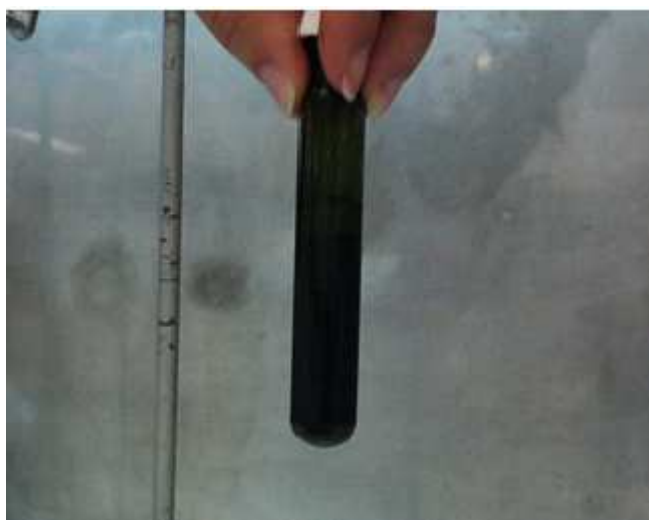
Os resultados obtidos na esterificação usando o método de *Lepage* e *Roy*, descritos em 4.5.1, encontram-se registados na Tabela 12.

**Tabela 12** Quantidade de biodiesel obtida por esterificação pelo método de *Lepage* e *Roy*.

Tubo	Óleo (mg)	Metanol (mL)	Ácido (mL)	Digestor (10 min a 100 °C)	Biodiesel (mg)
1	7,4	0,75	0,225		5,2
2	7,8	0,78	0,234		5,7
3	6,4	0,64	0,192		6,2
4	5,6	0,56	0,168		5,4

Com os resultados registados na Tabela 12 conseguimos obter um rendimento médio em massa de óleo de cerca de 82,4%.

Quanto aos resultados obtidos usando o método de transesterificação convencional, não foi possível identificar as duas fases entre o glicerol e o biodiesel, por isso não se conseguiu extrair o biodiesel. Isto aconteceu devido à elevada quantidade de clorofila que a *Chlorella vulgaris* apresenta, tornando a mistura, de glicerol e biodiesel, muito escura (Figura 20). Posteriormente, como não foi possível separar as duas fases, não foi possível analisar o biodiesel produzido para avaliar o seu poder calorífico.



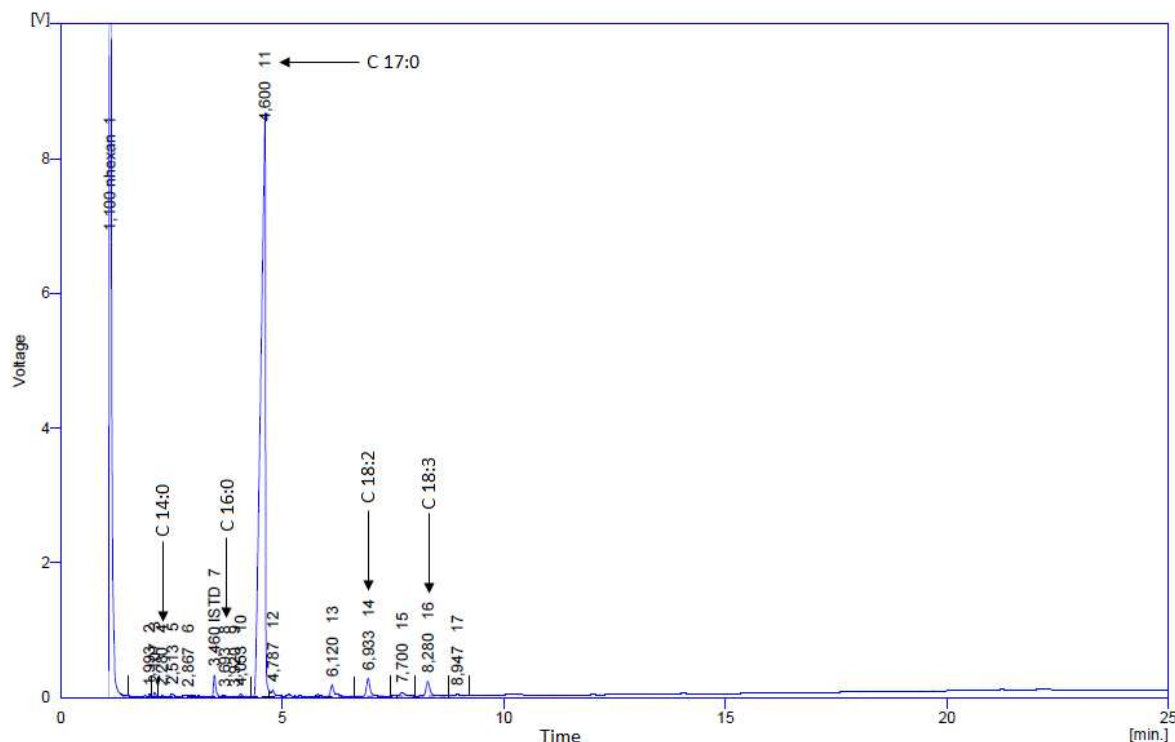
**Figura 20** Aspeto da mistura do biodiesel e glicerol obtidos por transesterificação.

### **5.5. Análise dos ésteres metílicos de ácidos gordos**

Para avaliar o potencial dos biocombustíveis obtidos a partir da biomassa algal é necessário avaliar o perfil de ésteres metílicos dos ácidos gordos (FAME – Fatty Acid Methyl Esters), que constituem o biodiesel. As propriedades destes ésteres vão ser responsáveis pela qualidade final do biodiesel produzido [13].

Os ésteres foram então analisados por cromatografia gasosa (GC (Dani, GC 1000 DPC) com FID e coluna para FAME's/FAEE's AT-WAX), usando um padrão interno de metilheptadecanoato com uma concentração de 10,118 mg/mL. A preparação e análise das amostras foi efetuada segundo o procedimento descrito na norma EN ISO 14103 (:2003) [42].

Na Figura 21 está representado o cromatograma relativo à análise dos ésteres do biodiesel produzido através do óleo extraído da microalga *Chlorella vulgaris*, cultivada em meio BBM 3N modificado.



**Figura 21** Cromatograma do biodiesel (ésteres do óleo)

Na Tabela 13 são apresentados os teores dos ésteres identificados.

**Tabela 13** Ésteres identificados e sua quantificação no total de amostra.

Tempo de retenção (min)	Área do pico (mV.s)	Éster	% éster
2,28	83,93	Miristato	0,67
3,69	74,02	Palmitato	0,58
4,60	62153,06	Padrão	493,56
6,93	1256,74	Linolato	10
8,28	1120,88	Linolenato	8,90

Dependendo da espécie, as microalgas produzem diferentes tipos de lípidos, hidrocarbonetos e outros óleos complexos. Nem todos os óleos provenientes de microalgas são satisfatórios para a produção de biodiesel, mas óleos adequados ocorrem vulgarmente [8].

Os ésteres identificados são considerados existentes na composição média do biodiesel, sendo que o linolato (C18:2) é o mais expressivo, com 10%. De acordo com os requisitos para a qualidade do biodiesel (EN 14214:2009) [30] é necessário que este apresente um teor de linolenato inferior a 12 % (m/m) o que se verifica no biodiesel produzido. Os

ésteres metílicos provenientes dos ácidos gordos palmíticos (C16:0) são considerados ideais para a produção de biodiesel de alta qualidade. Este constitui um parâmetro mais direto e preciso de avaliação do potencial da espécie de microalgas como substrato para a produção de biodiesel.

É importante salientar que esta análise se baseou sobretudo na identificação dos ésteres encontrados e não pela sua quantificação, uma vez, que existem pigmentos na mistura, resultantes da extração do óleo por solvente, a massa de amostra considerada é muito mais elevada do que a massa de ésteres existentes nesta, o que faz com que o valor calculado de teor de ésteres seja mais reduzido. Por outro lado, a amostra era demasiado pequena, o que pode ter levado a que se excluíssem picos por confusão com ruído do equipamento ou pelo facto de serem quase impercetíveis. Pode-se ainda considerar que como foi necessário transferir a amostra, após a reação, para um recipiente adequado, podem ter ocorrido perdas, quer na transferência, quer na filtração, ou que o método de transesterificação possa não ter sido totalmente eficiente, não convertendo todos os ácidos gordos em ésteres.





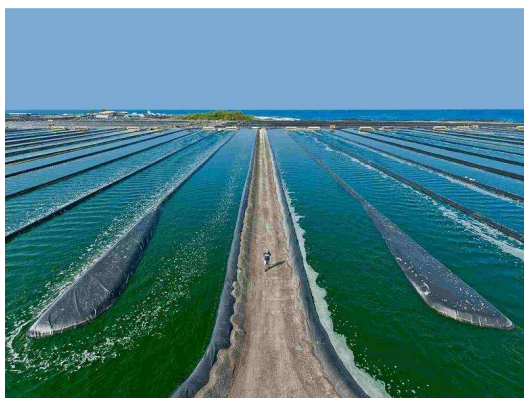
## 6. Análise económica

Neste capítulo será apresentado um modelo industrial de produção de biodiesel através da *Chlorella vulgaris*, bem como os preços associados ao mesmo, obtendo assim o custo final de produção do biodiesel.

### 6.1. Identificação, dimensionamento e custos do sistema de cultura

O sistema de cultivo eleito foi do tipo lagoa, já que no nível de produção industrial, é o sistema de cultura semelhante aos fotobiorreatores utilizados no laboratório.

O sistema implementado será do tipo lagoa *raceway*, e consistirá em canais feitos no solo com aproximadamente 0,3 m de profundidade, 30 m de largura e 100 m de comprimento, revestidos com lona PEBD (polietileno de baixa densidade) por onde circulará a cultura microalgal. Para que o meio de cultura se encontre em contínuo movimento, de forma a arejar a cultura, os canais terão um desnível para poderem correr naturalmente, sendo posteriormente auxiliados por uma bomba que faz com que a cultura retorne ao ponto mais alto do canal (Figura 22).



**Figura 22 Sistema de cultivo de microalgas em lagoas *raceway* [43].**

O volume de cultura obtido, por cada cultura efetuada, é de 2.250.000 L, isto considerando 20 dias para atingir a concentração máxima tendo uma margem de 5 dias para manutenção e limpeza. Assim o volume total de cultura a produzir anualmente foi estimado em 32.850.000 L/ano, o que permitirá obter cerca de 1.251,44 L/ano de óleo de microalgas, isto quando utilizamos os valores de produção obtidos em laboratório. Mas utilizando valores de produção referenciados na literatura podemos chegar a 29.795,92 L de óleo por ano.

Os equipamentos necessários para este sistema são, principalmente, bombas de circulação, compressores; também será necessária lona plástica de PEBD. O custo de aquisição e de funcionamento associados aos mesmos encontram-se na Tabela 14.

**Tabela 14 Custos associados à aquisição e funcionamentos dos equipamentos básicos.**

	Dimensões	Custo (€)	Potência (kW)	Horas trabalho dia	Consumo (kWh)
Bomba de meio de cultura (centrifuga) X3	10 m <sup>3</sup> /h	1.399,71 €	6	12	72
Centrifuga (Evado)	7 m <sup>3</sup> /h	15.000,00 €	7,67	1	7,67
Moinho (bead mill)	1 ton/h	19.600,00 €	10	2	20
Misturadora	—	450,00 €	0,75	2	1,5
Tanque de floculação 20 m <sup>3</sup>	20 m <sup>3</sup>	1.500,00 €	—	—	—
<b>Custo Material (€)</b>		<b>37.949,71 €</b>		<b>Total de consumos por dia</b>	<b>101,17</b>
				<b>Consumo Anual (kWh/ano)</b>	<b>36927,05</b>
				<b>Preço da Energia (kWh)</b>	<b>0,1418</b>
				<b>Custo Energético (€/ano)</b>	<b>5.236,26 €</b>

Para a produção de uma grande quantidade de biomassa é necessária uma extensão de terreno considerável, bem como a lona plástica PEBD. Assim na Tabela 15 encontram-se resumidos os custos associados à aquisição dos mesmos.

**Tabela 15 Custos associados à aquisição do terreno e da lona PEBD.**

<b>Custos com a instalação</b>	
Área do terreno (m <sup>2</sup> )	10000
Custo do terreno (€/m <sup>2</sup> )	6,00 €
Custo terreno (€)	<b>60.000,00 €</b>
Área total do filme (m <sup>2</sup> )	9000
Preço filme (€/m <sup>2</sup> )	0,17 €
Custo total filme	<b>1.530,00 €</b>
Custos com equipamentos	<b>37.949,71 €</b>
Margem de 5%	4.973,99 €
<b>Custo inicial total por hectare (€)</b>	<b>104.453,70 €</b>

## 6.2. Custo do meio de cultura

O meio de cultura considerado para o cultivo da *Chlorella vulgaris* foi referido anteriormente (Meio BBN 3N modificado). A Tabela 16 apresenta os custos associados à produção do meio BBN 3N modificado, utilizando reagentes a preços industriais.

Como indica a Tabela 16, produzir 1 m<sup>3</sup> de cultura com meio BBN 3N modificado tem um custo de cerca de 2,45 € o que perfaz um custo anual de cerca de 80 435,43 € anuais.

Num segundo cenário optou-se por utilizar 95% do meio de cultura proveniente de um efluente para uma melhor otimização do processo, uma vez que o custo associado ainda é extremamente elevado, mesmo utilizando os preços dos reagentes industriais. Desta forma o custo anual associado à preparação do meio de cultura vai ser de 4 021,77 €.

**Tabela 16 Custos associados à preparação do meio de cultura.**

Reagentes	Preço tabela		Quantidade utilizada por litro de cultura		Preço por litro de cultura (€/L)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	€/kg	3,90	kg	1,50E-04	5,85E-04
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	€/kg	0,22	kg	3,50E-04	7,70E-05
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	€/kg	0,07	kg	7,50E-06	4,88E-06
NaNO <sub>3</sub>	€/kg	0,33	kg	2,25E-03	7,425E-04
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	€/kg	0,47	kg	2,50E-05	1,18E-05
NaCl	€/kg	0,15	kg	2,50E-05	3,75E-06
Na <sub>2</sub> -EDTA.2H <sub>2</sub> O	€/kg	2,03	kg	2,50E-05	5,08E-05
KOH	€/kg	0,72	kg	1,55E-05	1,12E-05
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	€/kg	0,28	kg	9,96E-06	2,79E-06
Ácido Sulfúrico	€/L	0,35	L	2,00E-06	7,08E-07
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	€/kg	0,65	kg	1,14E-05	7,43E-06
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	€/kg	0,43	kg	1,41E-07	6,13E-08
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	€/kg	1,56	kg	2,32E-08	3,62E-08
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	€/kg	2,17	kg	2,52E-08	5,47E-08
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	€/kg	0,43	kg	8,00E-09	3,47E-09
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	€/kg	36,21	kg	1,92E-08	6,95E-07
Água 2º escalão	€/L	9,50E-04	L	1	9,50E-04
CO <sub>2</sub> *	—	—	—	—	—
*O CO <sub>2</sub> é retirado da atmosfera não tendo qualquer tipo de custo					<b>Custo Total Reagentes (€/L)</b>
					0,00245 €/L
					<b>Litros de cultura/ano</b>
					32850000
					<b>Custo Total reagentes/ano (€/ano)</b>
					80435,43 €

### 6.3. Custo associados à recuperação da biomassa

Este processo foi efetuado usando uma centrífuga (Evado), cujos custos associados estão representados na Tabela 14. Assim na Tabela 17 estão representados os custos da floculação da biomassa que nos vai permitir rentabilizar o processo de extração em mais de cerca de 90%.

**Tabela 17 Custos associados à floculação.**

L <sub>floculante</sub> / L <sub>cultura</sub>	0,003
Custo floculante/ L	0,33
Quantidade utilizada por ano	98550
<b>Custos anuais</b>	<b>32521,5</b>

Analisando a Tabela 17 podemos observar que o custo associado ao Pax XL-10 é extremamente elevado.

Embora o Pax XL-10 consiga induzir eficientemente a floculação das microalgas reduzindo o volume de cultura a centrifugar em 92,33%, o seu custo é extremamente

elevado. Comparando os custos energéticos associados à centrifugação com os preços da floculação, podemos afirmar que não é vantajoso utilizar o Pax XL-10 para floculação da microalga, como alternativa à centrifugação.

#### 6.4. Custos associados à extração dos lípidos

A extração lipídica foi efetuada pelo método de *Halim* já descrito em 4.4.2. Os custos inerentes a este processo estão representados na Tabela 18.

**Tabela 18 Custos associados à extração de lípidos.**

	Preço tabela (€/L)	Quantidade utilizada por litro de cultura		Preço por litro de cultura
Hexano	0,725	L/L <sub>cultura</sub>	7,98E-03	5,79E-03
Isopropanol	7,24E-03	L/L <sub>cultura</sub>	5,32E-03	3,85E-05
<b>Total</b>				<b>0,006 €</b>
<b>Custo 1ª colheita</b>				<b>13 104,04 €</b>
<b>Custo anual*</b>				<b>9 565,95 €</b>

\* Consideraram-se perdas de 5% em cada extração; os solventes são recuperados e reutilizados

Na fase inicial do processo é necessário um grande investimento, mas como é possível recuperar quase na totalidade o Hexano e o Isopropanol, tendo perdas de apenas 5%, os custos reduzem significativamente. Este processo é auxiliado por um moinho (*bead mill*), cujos custos associados estão representados na Tabela 14.

#### 6.5. Custos do processo de transesterificação

A transesterificação foi efetuada segundo o processo descrito em 4.5.2. Os custos associados a este processo estão descritos na Tabela 19.

**Tabela 19 Custos associados ao processo de transesterificação.**

	Preço tabela		Quantidade utilizada por litro de cultura		Preço por litro de cultura (€)
NaOH	€/g	3,20E-04	g/L <sub>cultura</sub>	6,73E-05	2,15E-08
Metanol	€/L	0,507	L/L <sub>cultura</sub>	1,70E-06	8,62E-07
<b>Total</b>					<b>8,83E-07</b>
<b>Custo anual (€)</b>					<b>29,02 €</b>

A transesterificação é um processo bastante barato e de alguma forma bastante eficiente, uma vez que praticamente todo o óleo sujeito à transesterificação é convertido em biodiesel.

## 6.6. Custo do biodiesel

Combinando todos os custos obtidos anteriormente, chegou-se ao preço do biodiesel conforme resumido na Tabela 20.

**Tabela 20 Custo do biodiesel.**

Custo de produção do biodiesel	
Custo inicial	104.453,70 €
Amortização	6.963,58 €
Custo inicial do hex. e isop.(amortizado)	873,60 €
Custo energético (€/ano)	5.236,26 €
Custos dos reagentes/ano	4.021,77 €
Custo Flocculação/ano	32.521,50 €
Custo Ext. lípidos/ano	9.565,95 €
Transesterificação/ano	29,02 €
Custos totais anuais	59.211,68 €
Custo /L de cultura	0,001802486
<b>Custo biodiesel €/L</b>	<b>47,32 €</b>

Com base nos resultados de produção obtidos em laboratório, pode-se observar (Tabela 20) que o preço de produção do biodiesel é extremamente elevado, pelo que se optou por fazer uma outra abordagem, com os valores referenciados na literatura (Tabela 2). Desta forma obtivemos os custos referidos na Tabela 21.

**Tabela 21 Custo do biodiesel com valores de produção referenciados na literatura.**

Custo de produção do biodiesel	
Custo inicial	104.453,70 €
Amortização	6.963,58 €
Custo inicial do hex. e isop.(amortizado)	17.472,05 €
Custo energético (€/ano)	5.236,26 €
Custos dos reagentes/ano	4.021,77 €
Custo Flocculação/ano	32.521,50 €
Custo Ext. lípidos/ano	191.318,95 €
Transesterificação/ano	3.449,68 €
Custos totais anuais	260.983,79 €
Custo /L de cultura	0,007944712
<b>Custo biodiesel €/L</b>	<b>8,76 €</b>

Segundo os valores de produção referenciados, o preço por litro de biodiesel baixa consideravelmente em relação ao preço da Tabela 20, ficando o biodiesel nos 8,76 €/L, o que mesmo assim é um preço extremamente elevado.

Tendo em conta o que foi descrito em 6.3, se não considerarmos a floculação teremos que utilizar duas centrifugas a trabalharem em média 6 horas por dia, para centrifugar os 32.850.000 L de cultura. Assim, os custos de aquisição de equipamento aumenta para 52.949,71 €, bem como o consumo energético que sobe para 9.602,99 € contribuindo assim para um aumento de custos anuais de 5.366,73 €. Mas por outro lado, há uma poupança de 27.154,77 € relativa à floculação com o Pax XL-10.

Com estes valores o preço do biodiesel segundo os resultados em laboratório e os resultados referenciados em literatura passam para 25,66 €/L e 7,85 €/L.

## 7. Conclusões

Esta dissertação tinha como principais objetivos a análise da viabilidade económica da utilização da *Chlorella vulgaris* como matéria-prima para a produção de biodiesel. Assim, para além de otimizar as condições de cultivo e colheita da microalga, foi necessário proceder-se à extração de óleo da biomassa microalgal, para a produção do biodiesel e a caracterização do óleo e biodiesel produzidos, bem como a análise económica da produção a nível industrial, com base nos resultados experimentais obtidos. Em termos gerais os objetivos foram cumpridos, com exceção da avaliação do poder calorífico do biodiesel produzido.

A primeira etapa do processo passava pelo cultivo da *Chlorella vulgaris* em ambiente não controlado, de forma a criar um cenário de lagoa, com vista a estudar o crescimento da microalga. Os resultados obtidos não foram os esperados, sendo o crescimento observado inferior a 75% relativamente ao valor mínimo referenciado na bibliografia. Uma vez que os trabalhos decorreram durante a estação do verão, as temperaturas altas que se fizeram sentir afetaram o crescimento das microalgas. Por outro lado, o fotobiorreator encontrava-se no interior do laboratório, o que faz com que a luz solar não chegasse com mais eficiência às culturas, dificultando o seu ciclo de desenvolvimento.



A otimização na etapa de recolha das microalgas foi conseguida utilizando um floculante Pax XL-10, alcançando-se um rendimento superior a 90% com a adição de 3 mL de Pax XL-10, por cada litro de cultura. No entanto a adição deste floculante deixa resíduos de alumínio no sobrenadante, em concentrações da ordem dos 1,079 ppm, o que pode obrigar a um tratamento da água residual para lhe retirar este alumínio, antes de o descarregar no domínio hídrico.

A floculação foi tentada também com o aumento do pH, através da adição de NaOH, mas para que conseguíssemos alcançar resultados minimamente satisfatórios seria necessário elevar o pH até cerca de 13, o que se torna extremamente difícil e caro a nível industrial, uma vez que, posteriormente seria necessário o tratamento do sobrenadante antes de o enviar para o meio recetor, fazendo-nos, desta forma, abandonar esta opção.

A *Chlorella vulgaris* apresentou um teor lipídico de cerca de 16,6% em biomassa seca, dentro da gama de valores referidos na literatura. Na extração lipídica procedeu-se à destilação do hexano de forma a recuperá-lo, obtendo-se uma recuperação de 93,12% do hexano utilizado.

Na obtenção do biodiesel em grande escala não se conseguiu observar a ocorrência de duas fases devido à grande quantidade de pigmentos na mistura, o que por um lado pode ser visto como um fator positivo se, futuramente, conseguirmos otimizar o processo de forma a extrair os pigmentos e utilizá-los como produto de valor acrescentado.

A obtenção de biodiesel, por esterificação, foi possível, conseguindo-se um rendimento médio em massa de óleo de cerca de 82,4%.

Submetendo o biodiesel produzido a uma análise por cromatografia gasosa, foi possível concluir que este apresentava apenas 49,5% de esteres na sua composição. Foi possível identificar e quantificar alguns ésteres, nomeadamente o miristato (0,67%), o palmitato (0,58%), o linolato (10%) e o linolenato (8,9%). Tendo em conta que a análise se baseou sobretudo na identificação dos ésteres encontrados e não pela sua quantificação, uma vez, que existem pigmentos na mistura, resultantes da extração do óleo por solvente, a massa de amostra considerada é muito mais elevada do que a massa de ésteres existentes nesta, o que faz com que o valor calculado de teor de ésteres seja mais reduzido, por outro lado a amostra era demasiado pequena, o que pode ter levado a que se excluíssem picos por confusão com ruído do equipamento ou pelo facto de serem quase impercetíveis.

Na análise económica de produção de biodiesel, a partir da *Chlorella vulgaris*, pode-se concluir, de forma geral, que atualmente não é viável a produção de biodiesel pelos métodos apresentados.

O objetivo da utilização do floculante Pax XL-10 era a redução de custos na produção do biodiesel, mas na análise económica, este revelou-se extremamente dispendioso agravando ainda mais o custo do biodiesel, representando cerca de 54,92 % do custo deste.

Quando a não utilização da floculação, cerca de 34 % dos custos estão associados à extração dos lípidos, sendo que 28,48 % se devem à aquisição de equipamentos e terreno e 21,07 % à colheita das microalgas. Mas quando otimizamos o processo com valores de extração mais elevados, os custos de aquisição de equipamentos baixam para 3,43%, concentrando-se 81,80 % do custo na extração dos lípidos.

Para que este processo se torne mais apetecível, aos olhos dos investidores, é necessário complementá-lo com outros processos, nomeadamente com o tratamento de efluentes como fonte de nutrientes, a extração de pigmentos como produto de valor acrescentado, produção de biogás, através da decomposição anaeróbia da biomassa, ou até mesmo a compostagem da biomassa para produção de fertilizantes.

## 8. Avaliação do trabalho realizado

### 8.1. Objetivos realizados

Com este trabalho foi possível elaborar as curvas de crescimento da *Chlorella vulgaris* em meio BBN 3N modificado, sob um cenário semelhante a uma lagoa.

Foi possível extrair biomassa e óleo que posteriormente foi esterificado e transesterificado para produzir biodiesel. Com a esterificação conseguiu-se identificar e quantificar ésteres, sendo que com a transesterificação, devido à elevada quantidade de pigmentos, não foi possível identificar as fases entre o biodiesel e o glicerol, não conseguindo assim examinar o teor de ésteres.

Por fim, como não foi possível separar o biodiesel do glicerol, também não foi possível avaliar o seu poder calorífico.

### 8.2. Limitações e Trabalhos futuros

No decorrer do trabalho foram surgindo algumas limitações:

- Temperatura interior no laboratório demasiado elevada (em particular nos últimos

meses do decurso deste trabalho, na Primavera e Verão), sendo esta pouco adequada ao crescimento destas espécies de microalgas;

- Intensidade da luz solar limitada, reduz a taxa de crescimento e, por conseguinte, a produtividade de biomassa;
- A impossibilidade logística e temporal para analisar outros tipos de flocculantes e para replicar todas as culturas para validação dos resultados.

Como trabalhos futuros propõe-se:

- A otimização das condições de cultivo tendo em atenção os parâmetros já estudados ou outros, tais como a temperatura;
- O cultivo, em maior escala, das microalgas sujeitas às diferentes condições de crescimento, a fim de se avaliar a sua influência na produtividade e qualidade do óleo obtido;
- Avaliar o comportamento de novos flocculantes e custos agregados;
- Estudos de otimização do processo e de viabilidade económica com processamentos complementares, tais como:
  - Produção de produtos de valor acrescentado (pigmentos);
  - Produção de biogás por decomposição da biomassa;
  - Produção de corretivo orgânico por compostagem;
  - Produção de ração animal.

## Referências Documentais

- [1] European Environment Agency (EEA), “Overview of the European energy system (ENER 036),” 27-Mar-2013. [Online]. Available: <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/overview-of-the-european-energy-system/assessment>. [Accessed: 20-Oct-2013].
- [2] European Environment Agency (EEA), “Final energy consumption by sector (CSI 027/ENER 016),” 28-Feb-2013. [Online]. Available: <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/final-energy-consumption-by-sector-5/assessment>. [Accessed: 20-Oct-2013].
- [3] *Directive 2009/28/EC of the European Parliament and of the Council of 23 April 2009.*
- [4] Department of Public Information, News and Media Division, New York, “Press Release POP/952, World population will increase by 2,5 billion by 2050; People over 60 to increase by more than 1 billion,” 13-Mar-2007. [Online]. Available: <http://www.un.org/News/Press/docs/2007/pop952.doc.htm>. [Accessed: 20-Oct-2013].
- [5] J. A. Foley, N. Ramankutty, K. A. Brauman, E. S. Cassidy, J. S. Gerber, M. Johnston, N. D. Mueller, C. O’Connell, D. K. Ray, P. C. West, C. Balzer, E. M. Bennett, S. R. Carpenter, J. Hill, C. Monfreda, S. Polasky, J. Rockström, J. Sheehan, S. Siebert, D. Tilman, and D. P. M. Zaks, “Solutions for a cultivated planet,” *Nature*, vol. 478, no. 7369, pp. 337–342, Oct. 2011.
- [6] J. van Haveren, E. L. Scott, and J. Sanders, “Bulk chemicals from biomass,” *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, vol. 2, no. 1, pp. 41–57, 2008.
- [7] *Resolução do Conselho de Ministros n.º 20/2013.*
- [8] Y. Chisti, “Biodiesel from microalgae,” *Biotechnology Advances*, vol. 25, no. 3, pp. 294–306, May 2007.
- [9] T. M. Mata, A. A. Martins, and N. S. Caetano, “Advances in biodiesel production - ch09 - Microalgae processing for biodiesel production,” *Advances in biodiesel production - ch09 - Microalgae processing for biodiesel production*, 2012.
- [10] O. Pulz, “Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 57, no. 3, pp. 287–293, Oct. 2001.
- [11] T. M. Mata, A. A. Martins, and N. S. Caetano, “Microalgae for biodiesel production and other applications: A review,” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 14, no. 1, pp. 217–232, Jan. 2010.
- [12] T. M. Mata, A. A. Martins, and N. S. Caetano, “Microalgae processing for biodiesel production,” *Woodhead Publishing Series in Energy*, 39, pp. 204–231, 2012.
- [13] A. Demirbas and M. Fatih Demirbas, “Importance of algae oil as a source of biodiesel,” *Energy Conversion and Management*, vol. 52, no. 1, pp. 163–170, Jan. 2011.
- [14] K. G. Satyanarayana, A. B. Mariano, and J. V. C. Vargas, “A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials,” *International Journal of Energy Research*, vol. 35, no. 4, pp. 291–311, Mar. 2011.
- [15] C. U. Ugwu, H. Aoyagi, and H. Uchiyama, “Photobioreactors for mass cultivation of algae,” *Bioresource Technology*, vol. 99, no. 10, pp. 4021–4028, Jul. 2008.
- [16] J. R. Benavente-Valdés, J. C. Montañez, C. N. Aguilar, and A. Méndez-Zavala, “Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores,” *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, vol. 4, no. 7.
- [17] A. Mariano, “Os Fotobiorreatores do NPDEAS,” *Os Fotobiorreatores do NPDEAS*, 21-Jun-2011. [Online]. Available: <http://npdeas.blogspot.pt/2011/06/os-fotobiorreatores-do-npdeas.html>. [Accessed: 05-Aug-2013].

- [18] Y. Chisti, "Biodiesel from microalgae beats bioethanol," *Trends in Biotechnology*, vol. 26, no. 3, pp. 126–131, Mar. 2008.
- [19] E. Molina Grima, E.-H. Belarbi, F. . Acien Fernández, A. Robles Medina, and Y. Chisti, "Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics," *Biotechnology Advances*, vol. 20, no. 7–8, pp. 491–515, Jan. 2003.
- [20] C.-Y. Chen, K.-L. Yeh, R. Aisyah, D.-J. Lee, and J.-S. Chang, "Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review," *Bioresource Technology*, vol. 102, no. 1, pp. 71–81, Jan. 2011.
- [21] H. M. Amaro, A. C. Guedes, and F. X. Malcata, "Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel," *Applied Energy*, vol. 88, no. 10, pp. 3402–3410, Oct. 2011.
- [22] D. Vandamme, I. Foubert, and K. Muylaert, "Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production," *Trends in Biotechnology*, vol. 31, no. 4, pp. 233–239, Apr. 2013.
- [23] L. Brennan and P. Owende, "Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 14, no. 2, pp. 557–577, Feb. 2010.
- [24] "Gouveia, L, 2011. Microalgae as a Feedstock for Biofuels. Springer.2011: 68 pp."
- [25] J. Folch, M. Lees, and G. H. Sloane Stanley, "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues," *J. Biol. Chem.*, vol. 226, no. 1, pp. 497–509, May 1957.
- [26] E. G. Bligh and W. J. Dyer, "A rapid method of total lipid extraction and purification," *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, vol. 37, no. 8, pp. 911–917, Aug. 1959.
- [27] M. Cooney, "Extraction of Bio-oils from Microalgae," *SEP PURIF REV*, vol. 38, no. 4, pp. 291–325, 2009.
- [28] R. Halim, B. Gladman, M. K. Danquah, and P. A. Webley, "Oil extraction from microalgae for biodiesel production," *Bioresource Technology*, vol. 102, no. 1, pp. 178–185, Jan. 2011.
- [29] F. Adam, M. Abert-Vian, G. Peltier, and F. Chemat, "'Solvent-free' ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: A green, clean and scalable process," *Bioresource Technology*, vol. 114, pp. 457–465, Jun. 2012.
- [30] "NP EN14214, 2009, FAME for diesel engines, requirements and test methods, IPQ, Portugal." .
- [31] A. Demirbas, "Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats," *Energy Conversion and Management*, vol. 49, no. 1, pp. 125–130, Jan. 2008.
- [32] Ö. Tokuşoglu and M. k. üUnal, "Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*," *Journal of Food Science*, vol. 68, no. 4, pp. 1144–1148, 2003.
- [33] S. K. Hoekman, A. Broch, C. Robbins, E. Cenicerros, and M. Natarajan, "Review of biodiesel composition, properties, and specifications," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 16, no. 1, pp. 143–169, Jan. 2012.
- [34] "Óleo de palma - Preço Mensal - Preços das Mercadorias," *Óleo de palma - Preço Mensal - Preços das Mercadorias*. [Online]. Available: <http://www.indexmundi.com/pt/pre%E7os-de-mercado/?mercadoria=%C3%B3leo-de-palma>. [Accessed: 14-Aug-2013].
- [35] I. Zardo, "Análise de viabilidade econômica da produção de biodiesel a partir de microalgas," Universidade Federal do Rio Grande Sul, 2011.
- [36] "Banco de Portugal," *Banco de Portugal*. [Online]. Available: <http://www.bportugal.pt/pt-PT/Estatisticas/Dominios%20Estatisticos/EstatisticasCambiais/Paginas/Conversor.aspx#anchor>. [Accessed: 15-Aug-2013].
- [37] A. Vonshak, *Spirulina Platensis Arthrospira: Physiology, Cell-Biology And Biotechnology*. Taylor & Francis, 2002.

- [38] J. Guimarães, R. Amaral, M. F. Santos, and L. M. A. Santos, *Colheita, identificação e conservação de microalgas*. ACOI, Algoteca do Departamento de Botânica Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2009.
- [39] Z. Wu, Y. Zhu, W. Huang, C. Zhang, T. Li, Y. Zhang, and A. Li, "Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium," *Bioresource Technology*, vol. 110, pp. 496–502, Apr. 2012.
- [40] G. Lepage and C. C. Roy, "Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification.," *J. Lipid Res.*, vol. 25, no. 12, pp. 1391–1396, Dec. 1984.
- [41] F. Bertold, E. Sant'Anna, and J. Oliveira, "Revisão: Biotecnologia de microalgas," *B.CEPPA*, vol. 26, no. 1, pp. 9–20, Jun. 2008.
- [42] "NP EN14103, 2010, FAME determination of esters and linolenic acid methyl esters contents, IPQ."
- [43] MTS/IEEE kona, "Oceans'11, Tour of facilities at the natural energy laboratory of Hawaii authority," 19-Sep-2011. [Online]. Available: <http://www.oceans11mtsieekona.org/main.cfm/EID/46/Special-Tour-of-Facilities-at-NELHA/>. [Accessed: 29-Oct-2013].

## Anexo A. Calibração - Curvas de crescimento da *Chlorella vulgaris*.

Visando a aplicação do método de densidade ótica, para a quantificação da concentração de biomassa algal, na avaliação do crescimento das culturas em estudo foi necessário estabelecer uma relação entre a densidade ótica (OD) e a concentração em biomassa seca. Para tal, foi traçada uma curva de calibração de densidade ótica vs concentração de biomassa seca para a *Chlorella vulgaris* (Figura 23) a partir de diferentes soluções padrão (Figura 24), preparadas com biomassa liofilizada, colhida de uma cultura em meio padrão. As leituras realizaram-se num espectrofotômetro UV-Vis (*Shimadzu* UV-160 A) a um comprimento de onda de 683,5 nm, correspondente ao pico máximo de absorvância determinado para a cultura mãe (Figura 25).

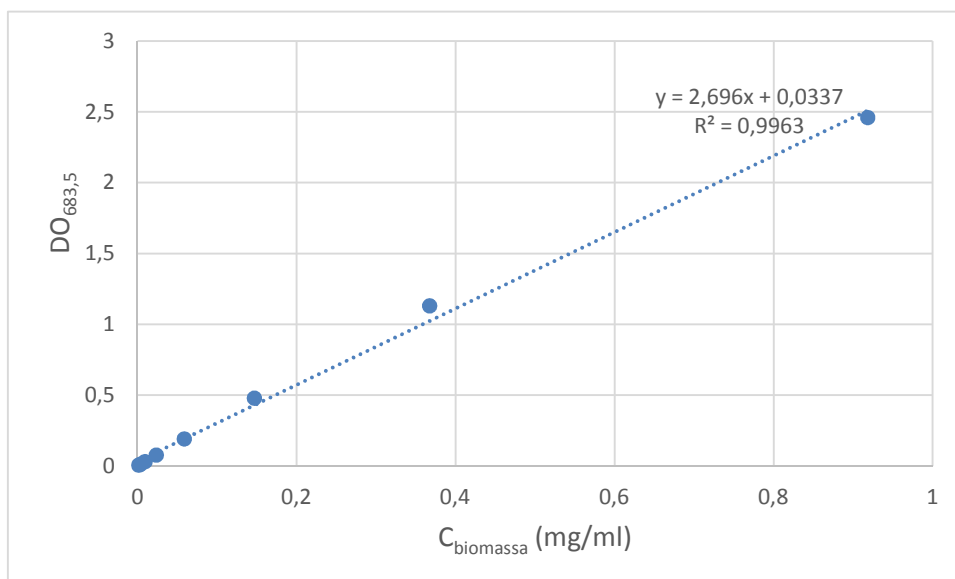
Os valores de densidade ótica obtidos para as diferentes soluções-padrão estão registrados na Tabela 22. A curva de calibração resultante do ajuste destes valores encontra-se representada na Figura 23, podendo a concentração de biomassa microalgal (em g/L de biomassa seca) ser estimada a partir da leitura da absorvância da cultura a 683,5 nm, usando a reta de calibração:  $DO_{683,5} = 2,696 C_{\text{biomassa seca}} + 0,0337$ .

**Tabela 22 Valores de densidade ótica obtidos para as diferentes concentrações.**

	<b>C<sub>biomassa seca</sub> (g/L)</b>	<b>DO<sub>683,5</sub></b>
1	5,740	2,480
2	2,296	2,489
3	0,9184	2,460
4	0,3674	1,131
5	0,1469	0,4800
6	0,05878	0,1920
7	0,02351	0,07800
8	0,009404	0,03200
9	0,003762	0,01400
10	0,001505	0,00700



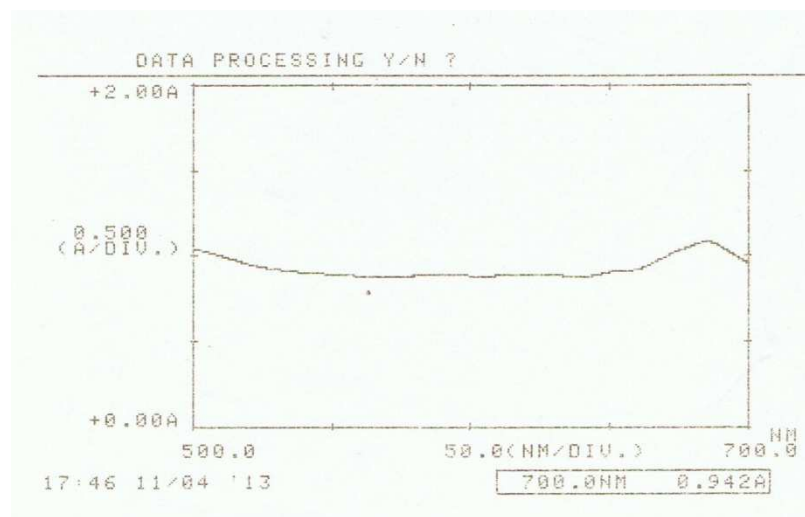
Os valores do padrão 1 e 2 não foram usados, porque se observa a saturação na absorvância medida no espectrofotômetro UV-Vis, isto é, a resposta deixa de ser linear.



**Figura 23** Curva de calibração de densidade ótica vs concentração de biomassa seca para a *Chlorella vulgaris*.



**Figura 24** Soluções-padrão preparadas a partir da biomassa de *Chlorella vulgaris*.



**Figura 25 Pico máximo de absorvância da cultura mãe.**

## Anexo B. Crescimento das culturas de *Chlorella vulgaris*

Na fase inicial, as microalgas foram cultivadas em Erlenmeyers de 1 L e posteriormente de 5 L. A monitorização de crescimento nesta fase foi efetuada por controlo visual, através da coloração apresentada pela cultura (Figura 6).

O cultivo de microalgas em fotobiorreatores de 30 L foi efetuado em regime não controlado de luz, de temperatura e de contaminações. As culturas foram sujeitas apenas a iluminação natural e às variações diárias e sazonais de luz e de temperatura.

O controlo de crescimento nesta fase foi efetuado pelo método da densidade ótica, monitorizando a absorvância das culturas a partir de amostras de 3 mL da suspensão de microalgas, tomando como referência o meio de cultura, num espectrofotómetro UV/Vis (Shimadzu UV-160 A) (Figura 7).

A avaliação do crescimento da cultura de 30 L encontra-se registada na Tabela 23.

**Tabela 23 Avaliação do crescimento da cultura de *Chlorella vulgaris* em fotobiorreator de 30 L.**

	Dia	Data	Leitura	1ª Célula	2ª Célula	3ª Célula	Média	C <sub>biomassa seca</sub> (mg/mL)
Sex.	0	10/05/2013	1	0,099	0,099	0,099	0,099	0,0243
			2	0,099	0,099	0,100		
			3	0,099	0,099	0,100		
Seg.	3	13/05/2013	1	0,115	0,115	0,117	0,116	0,0304
			2	0,115	0,115	0,117		
			3	0,115	0,115	0,117		
Ter.	4	14/05/2013	1	0,128	0,127	0,127	0,127	0,0347
			2	0,127	0,128	0,127		
			3	0,127	0,128	0,127		
Qua.	5	15/05/2013	1	0,143	0,143	0,146	0,144	0,0410
			2	0,144	0,143	0,146		
			3	0,144	0,143	0,145		
Qui.	6	16/05/2013	1	0,16	0,163	0,163	0,162	0,0476
			2	0,159	0,164	0,163		
			3	0,160	0,163	0,163		

	<b>Dia</b>	<b>Data</b>	<b>Leitura</b>	<b>1ª Célula</b>	<b>2ª Célula</b>	<b>3ª Célula</b>	<b>Média</b>	<b>C<sup>b</sup> biomassa seca (mg/mL)</b>
Sex.	7	17/05/2013	1	0,171	0,178	0,173	0,175	0,0523
			2	0,171	0,178	0,175		
			3	0,171	0,178	0,178		
Seg	10	20/05/2013	1	0,199	0,200	0,199	0,199	0,0615
			2	0,199	0,200	0,199		
			3	0,199	0,200	0,200		
Ter	11	21/05/2013	1	0,217	0,214	0,216	0,216	0,0675
			2	0,217	0,214	0,216		
			3	0,218	0,214	0,215		
Qua	12	22/05/2013	1	0,235	0,236	0,234	0,235	0,0748
			2	0,232	0,236	0,237		
			3	0,236	0,235	0,237		
Qui	13	23/05/2013	1	0,252	0,249	0,251	0,251	0,0806
			2	0,253	0,25	0,251		
			3	0,252	0,25	0,250		
Sex	14	24/05/2013	1	0,267	0,268	0,265	0,266	0,0862
			2	0,267	0,269	0,264		
			3	0,265	0,267	0,264		
Seg	17	27/05/2013	1	0,298	0,302	0,303	0,301	0,0990
			2	0,297	0,301	0,303		
			3	0,297	0,30	0,304		
Ter	18	28/05/2013	1	0,331	0,329	0,337	0,331	0,1104
			2	0,330	0,329	0,333		
			3	0,332	0,329	0,332		
Qua	19	29/05/2013	1	0,330	0,333	0,332	0,331	0,1102
			2	0,331	0,331	0,330		
			3	0,330	0,330	0,330		
Sex	21	31/05/2013	1	0,334	0,330	0,332	0,332	0,1107
			2	0,335	0,330	0,332		
			3	0,335	0,330	0,332		
Seg	24	03/06/2013	1	0,385	0,386	0,387	0,386	0,1306
			2	0,384	0,387	0,387		
			3	0,384	0,385	0,387		
Ter	25	04/06/2013	1	0,396	0,396	0,393	0,395	0,1341
			2	0,396	0,395	0,395		
			3	0,395	0,397	0,395		
Qua	26	05/06/2013	1	0,396	0,404	0,402	0,401	0,1363
			2	0,397	0,404	0,403		
			3	0,399	0,402	0,404		

	<b>Dia</b>	<b>Data</b>	<b>Leitura</b>	<b>1ª Célula</b>	<b>2ª Célula</b>	<b>3ª Célula</b>	<b>Média</b>	<b>C<sub>biomassa seca</sub> (mg/mL)</b>
Qui	27	06/06/2013	1	0,414	0,412	0,413	0,414	0,1411
			2	0,415	0,415	0,414		
			3	0,413	0,417	0,414		
Sex	28	07/06/2013	1	0,428	0,431	0,430	0,430	0,1471
			2	0,428	0,430	0,432		
			3	0,429	0,432	0,432		
Seg	31	10/06/2013	1	0,467	0,450	0,468	0,462	0,1587
			2	0,467	0,450	0,468		
			3	0,466	0,451	0,467		
Qui	34	13/06/2013	1	0,491	0,500	0,484	0,489	0,1690
			2	0,491	0,498	0,483		
			3	0,484	0,491	0,483		
Seg	38	17/06/2013	1	0,502	0,505	0,507	0,505	0,1749
			2	0,502	0,507	0,507		
			3	0,507	0,507	0,503		
Qua	40	19/06/2013	1	0,521	0,533	0,541	0,532	0,1847
			2	0,522	0,531	0,543		
			3	0,522	0,531	0,541		
Qui	41	20/06/2013	1	0,576	0,585	0,575	0,578	0,2019
			2	0,572	0,586	0,576		
			3	0,574	0,576	0,581		
Sex	42	21/06/2013	1	0,581	0,583	0,601	0,588	0,2055
			2	0,586	0,582	0,599		
			3	0,577	0,582	0,599		

## Anexo C. Aumento do pH como meio de indução da floculação.

Para o aumento do pH da cultura, com o intuito de provocar a floculação das microalgas *Chlorella vulgaris*, utilizou-se o reagente NaOH, que foi adicionado a uma cultura, cujo pH inicial era de 6,7 com uma absorvância de 0,120. Aumentou-se o pH para valores de 8 a 13, efetuando-se as respectivas leituras óticas de absorvância do sobrenadante, de 15 em 15 min, até um máximo de 90 min.

A Tabela 24 mostra os resultados obtidos com a adição de NaOH.

**Tabela 24 Absorvância do sobrenadante obtido com o aumento do pH.**

Tempo	pH						Absorvância
	8	9	10	11	12	13	
0							
15	0,114	0,115	0,117	0,117	0,120	0,035	
30	0,111	0,107	0,115	0,115	0,115	0,112	
45	0,111	0,110	<b>0,110</b>	0,112	0,108	0,013	
60	0,113	0,110	0,110	0,100	0,101	0,007	
75	0,109	0,110	0,115	0,106	0,079	0,007	
90	0,108	0,105	0,115	0,105	0,051	0,007	

De acordo com as observações registadas na Tabela 24, é necessário atingir-se um pH de 12 e um tempo de contacto de pelo menos 90 min para que a concentração de microalgas baixe significativamente. Ora isso significa que deverá ser utilizada uma quantidade elevada de NaOH, o que corresponde não só a um custo elevado com reagentes, como também à necessidade de neutralizar posteriormente o meio de cultura residual, antes de o descarregar no meio recetor.

## Anexo D. Análise dos ésteres metílicos de ácidos gordos.

Para a análise dos ésteres metílicos de ácidos gordos realizaram-se seis ensaios nos quais dois deles saturaram (2º e 3º ensaio) e não foram contabilizados. Através desses resultados foi calculada a média que nos levou ao valor de 49,5% de ésteres. Assim nas tabelas seguintes e figuras estão representados os resultados das análises cromatográficas realizadas para obtenção da média final do teor de ésteres.

**Tabela 25 Resultados da cromatografia 1º ensaio.**

<b>Tempo (min)</b>	<b>Área (mV.s)</b>	<b>%</b>
2,11	204,73	1,59
2,28	80,90	0,63
2,51	254,29	1,97
2,87	419,77	3,26
3,46	1262,26	9,79
3,69	142,40	1,10
3,92	53,70	0,42
4,05	190,60	1,48
4,60	63623,23	493,56
4,79	1378,93	10,70
6,12	1040,31	8,07
6,93	1494,58	11,59
7,70	362,39	2,81
8,28	1367,46	10,61
8,95	129,63	1,01
<b>Somatório</b>	<b>72005,16</b>	
<b>% Ésteres</b>	<b>65,0</b>	

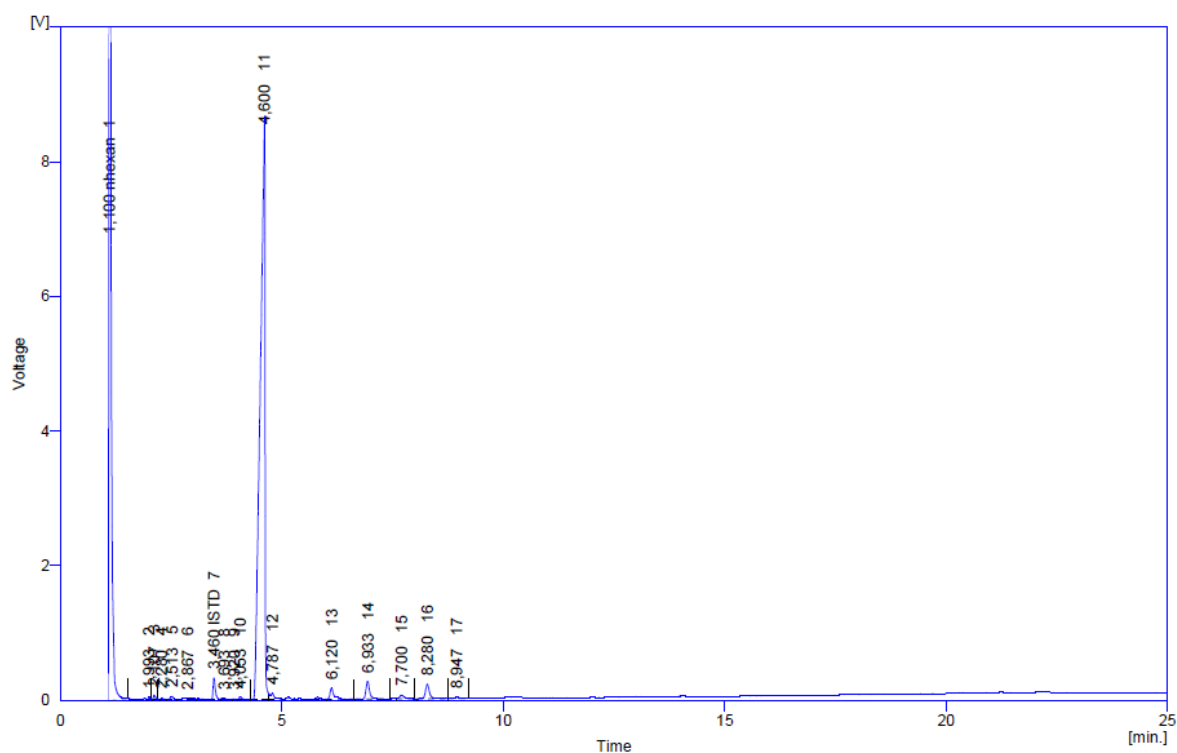


Figura 26 Cromatografia ao biodiesel do 1º ensaio (Figura 21).

Tabela 26 Resultados da cromatografia: 4º ensaio.

Tempo (min)	Área (mV.s)	%
2,01	74,95	0,54
2,12	242,71	1,75
2,29	97,59	0,70
2,53	151,45	1,09
3,12	25,64	0,18
3,48	1425,80	10,27
3,94	60,11	0,43
4,07	209,97	1,51
4,59	68491,62	493,56
4,79	813,28	5,86
5,15	230,36	1,66
5,83	102,44	0,74
6,14	890,92	6,42
6,95	1345,15	9,69
7,55	41,29	0,30
7,73	376,29	2,71
8,31	1118,77	8,06
<b>Somatório</b>	<b>75698,35</b>	
<b>% Ésteres</b>	<b>51,93</b>	



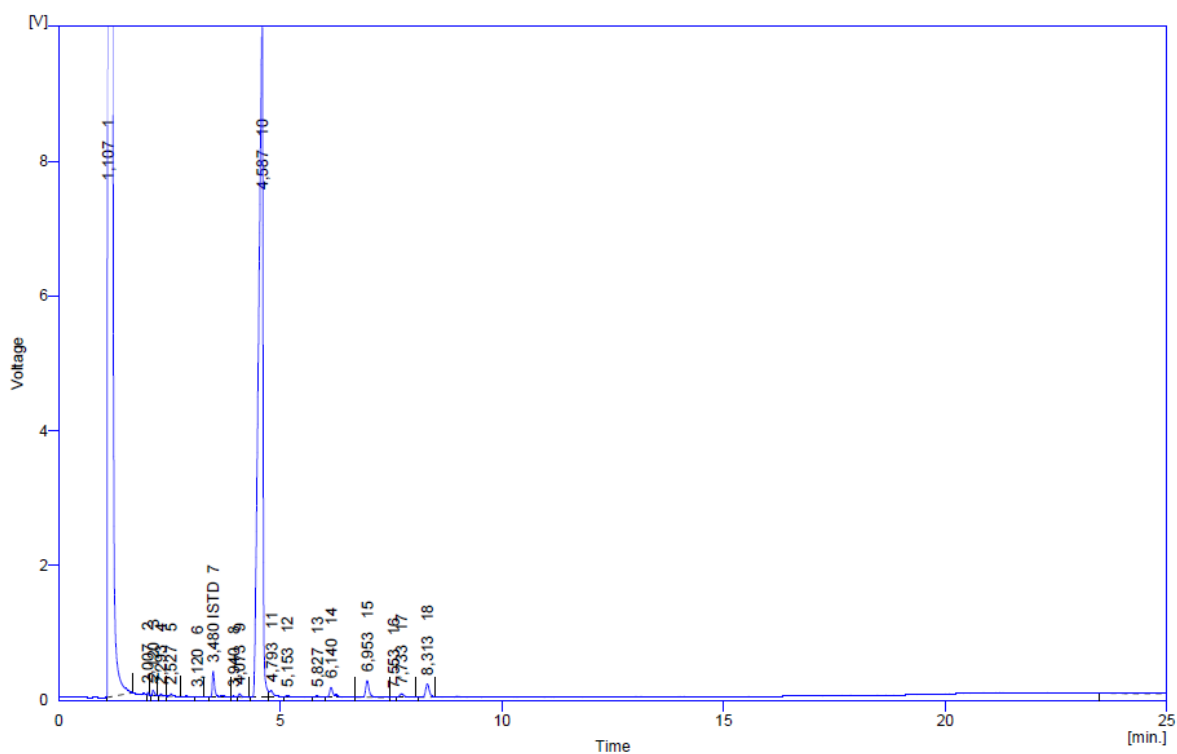
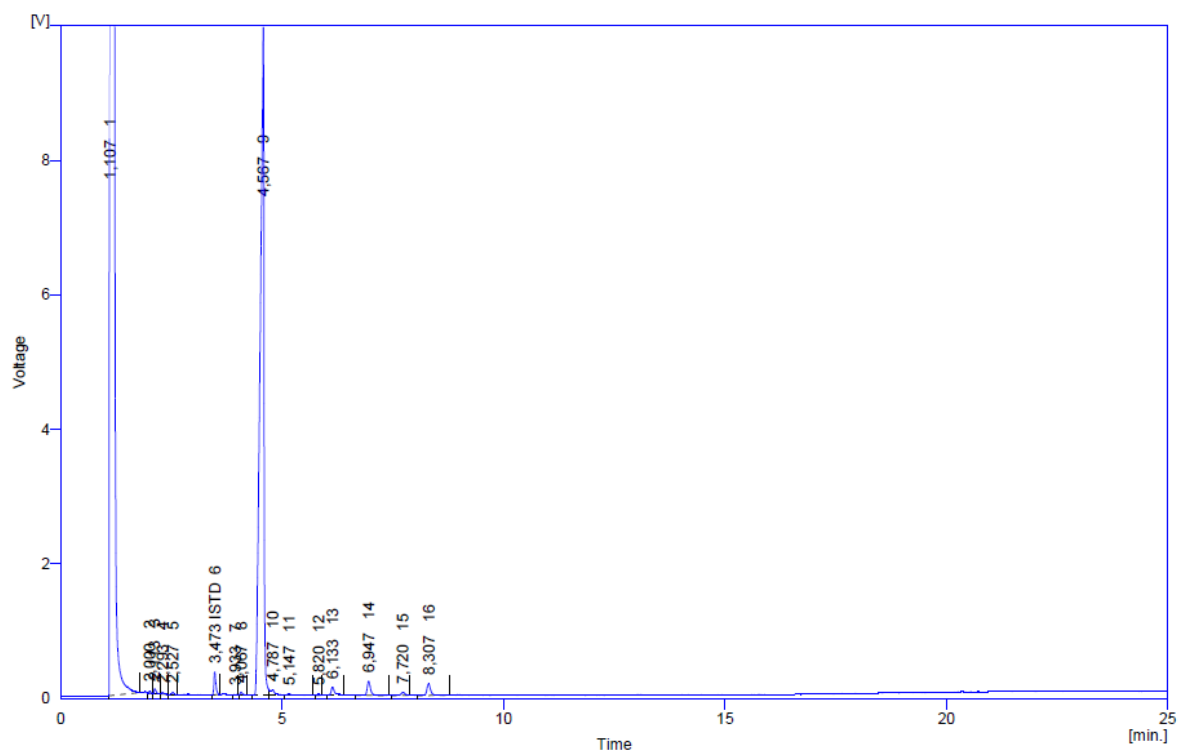


Figura 27 Cromatografia ao biodiesel: 4º ensaio.

Tabela 27 Resultados da cromatografia: 5º ensaio.

Tempo (min)	Área (mV.s)	%
2,00	76,86	0,65
2,11	219,84	1,85
2,29	85,23	0,72
2,53	102,45	0,86
3,47	1037,83	8,72
3,93	37,80	0,32
4,07	166,94	1,40
4,57	58751,52	493,56
4,79	679,42	5,71
5,15	194,11	1,63
5,82	61,72	0,52
6,13	710,43	5,97
6,95	1126,96	9,47
7,72	290,24	2,44
8,31	1062,29	8,92
<b>Somatório</b>	<b>64603,63</b>	
<b>% Ésteres</b>	<b>49,16</b>	



**Figura 28** Cromatografia do biodiesel do 5º ensaio.

**Tabela 28** Resultados da cromatografia do 6º ensaio.

Tempo (min)	Área (mV.s)	%
2,00	72,08	0,62
2,11	211,54	1,81
2,29	72,00	0,62
2,53	120,87	1,03
3,47	1049,39	8,97
3,65	156,54	1,34
3,93	55,78	0,48
4,07	182,74	1,56
4,56	57745,89	493,56
4,78	690,45	5,90
5,14	168,15	1,44
5,81	74,00	0,63
6,13	701,92	6,00
6,94	1060,26	9,06
7,71	284,05	2,43
8,30	935,02	7,99
<b>Somatório</b>	<b>63580,68</b>	
<b>% Ésteres</b>	<b>49,87</b>	

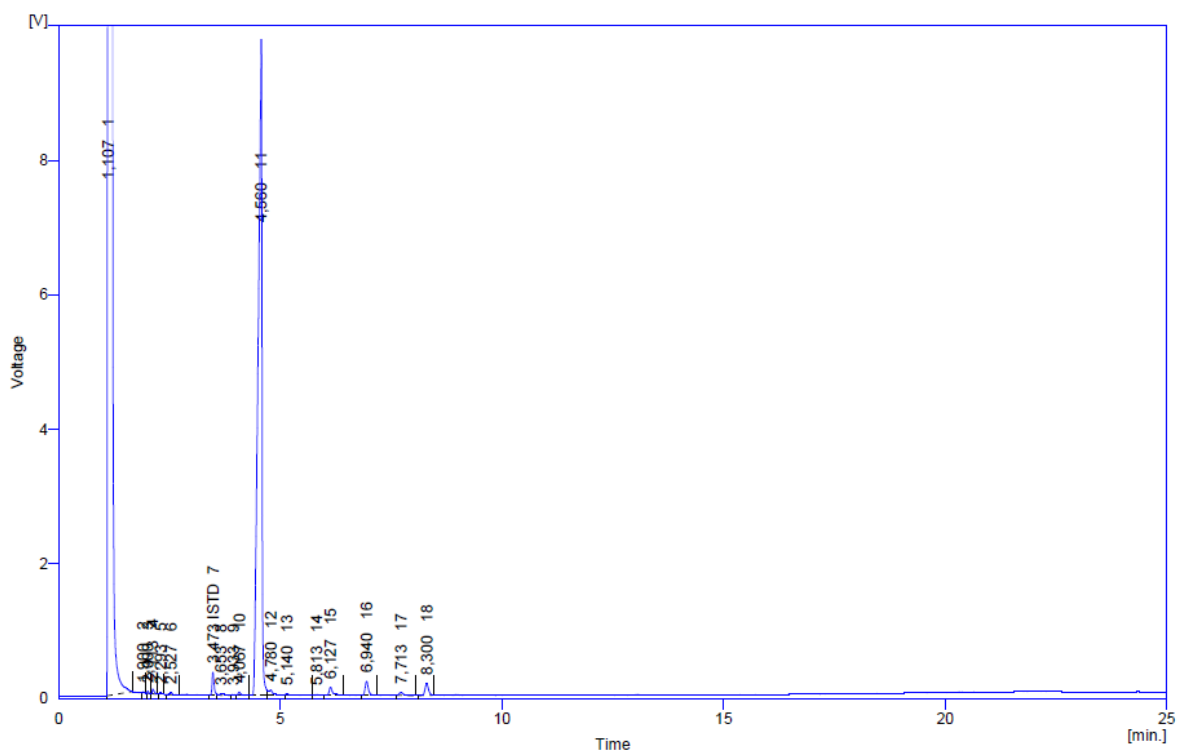


Figura 29 Cromatografia do biodiesel: 6º ensaio.

Tabela 29 Teor (%) de ésteres para cada ensaio e respectivas médias finais.

Ester	% ésteres	% ésteres	% ésteres	% ésteres	% ésteres	% ésteres	Média
	1º ensaio	2º ensaio	3º ensaio	4º ensaio	5º ensaio	6º ensaio	
C 14:0	0,63			0,70	0,72	0,62	0,67
C 16:0	1,10			0,43	0,32	0,48	0,58
C 17:0	493,56			493,56	493,56	493,56	493,561
C 18:2	11,59			9,69	9,47	9,06	9,95
C 18:3	10,61			8,06	8,92	7,99	8,90

Tabela 30 Área dos picos para cada ensaio e respetiva médias finais.

Ester	Área	Área	Área	Área	Área	Área	Média
	1º ensaio	2º ensaio	3º ensaio	4º ensaio	5º ensaio	6º ensaio	
C 14:0	80,90			97,59	85,23	72,00	83,93
C 16:0	142,40			60,11	37,80	55,78	74,02
C 17:0	63623,23			68491,62	58751,52	57745,89	62153,06
C 18:2	1494,58			1345,15	1126,96	1060,26	1256,74
C 18:3	1367,46			1118,77	1062,29	935,02	1120,88

